



**Clara Margarida Vaz  
Gomes**

**Estudo comparativo do efeito de cádmio em plantas  
e *calli* de *Helianthus annuus* L. – Avaliação de  
parâmetros de crescimento, senescência e do  
metabolismo da prolina**



**Clara Margarida Vaz  
Gomes**

**Estudo comparativo do efeito de cádmio em plantas  
e *calli* de *Helianthus annuus* L. – Avaliação de  
parâmetros de crescimento, senescência e do  
metabolismo da prolina**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia realizada sob a orientação científica da Prof. Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.



## O júri

### Presidente

Doutor **Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares**, Professor  
Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

### Vogais

Doutor **Fernando José Cebola Lidon**, Professor Auxiliar da  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de  
Lisboa

Doutor **Henrique Manuel Apolónia Coutinho da Fonseca**, Professor  
Auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutora **Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos**, Professora  
Auxiliar da Universidade de Aveiro

## Agradecimentos

Ao longo destes 2 anos de árduo trabalho não posso deixar de agradecer aos que mais me apoiaram e ajudaram nesta luta, e sem os quais esta meta não conseguiria alcançar;

À professora doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos, orientadora científica deste projecto, um eterno agradecimento pela revisão crítica e paciência deste manuscrito, pelos ensinamentos e apoio prestados desde o início, e ainda por toda a compreensão e disponibilidade que me dispensou;

Ao Armando, nosso técnico e amigo, sempre prestável, um especial obrigado pela ajuda nas tarefas laboratoriais;

Às colegas de luta no laboratório, Paula, Xana, Gloria, Lena, Sílvia, Lurdes e Susana que tanto me ajudaram e orientaram no labirinto do laboratório;

À D. Maria José pela paciência e ajuda na manutenção do material;

Ao Eng. Eugénio Soares, do laboratório central de análise pelas leituras das amostras no ICP;

Ao grupo docente do Centro de Estudos Educativos de Ançã, um agradecimento pelo incentivo, e à direcção em particular por me ter facilitado as tarefas escolares de forma a poder concluir este trabalho;

A todos os meus amigos, que sempre me deram força para levar até ao fim este projecto;

À família Baptista um eterno agradecimento pela amizade demonstrada, pelo encorajamento nos dias de maior angústia e por me terem disponibilizado os meios informáticos sem os quais não teria sido possível a conclusão deste manuscrito;

Ao Cláudio, principalmente, por me ajudar a acreditar nos meus valores, mas também pela paciência demonstrada e pelo apoio imprescindível na passagem do texto;

À Helena, Patrícia e Catarina um muito obrigado pela ajuda preciosa no trabalho de laboratório;

A toda a minha família: mãe, irmãos, cunhados e sobrinhos por todo o carinho, dedicação e preocupação demonstrados durante este tempo;

A todos, que de um modo geral me apoiaram directa ou indirectamente na elaboração deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

À minha Mafaldinha, uma especial atenção, a quem dedico este trabalho, de forma que lhe sirva de exemplo para a conquista da sua vida profissional futura;

À memória do meu Pai...

## Resumo

O cádmio é um dos metais pesados com maior poder contaminante, dado a sua elevada acumulação no meio ambiente. Neste trabalho pretendeu-se avaliar o efeito de elevadas concentrações de cádmio (5, 50 e 500  $\mu\text{M}$ ) em *calli* de girassol (*Helianthus annuus* L. cv. SH222) a crescer em meio MS e em plantas da mesma cultivar em cultura hidropónica. A análise do efeito do cádmio no crescimento das plantas e dos *calli* foi feita pela comparação de taxas de crescimento e pela avaliação de alguns parâmetros normalmente usados como indicadores de senescência: conteúdo de clorofilas, eficiência fotossintética, conteúdo de proteínas solúveis, permeabilidade membranar e teor hídrico. Avaliou-se ainda o efeito do cádmio na acumulação de nutrientes nos vários órgãos das plantas e nos *calli*. Finalmente, também se avaliou o efeito do cádmio no conteúdo da prolina, um aminoácido tradicionalmente associado a situações de stress, bem como o efeito deste metal na actividade de enzimas envolvidas no seu metabolismo: P5Cr, OAT e oxidase da prolina. Foi possível verificar que elevadas concentrações de cádmio provocam atrasos de crescimento, diminuindo o comprimento da porção aérea da planta bem como reduzindo os pesos fresco e seco das plantas e *calli*. O cádmio induziu ainda senescência nas plantas pois baixou a eficiência fotossintética, o conteúdo em clorofilas (apenas até concentrações de 50  $\mu\text{M}$ ), e o conteúdo em proteínas solúveis. A exposição a elevadas concentrações de cádmio levou ainda a degradação membranar nas plantas. Nos *calli* deste genótipo, elevadas concentrações de cádmio afectaram apenas os pesos fresco e seco e a concentração de proteínas solúveis. Após 21 dias de tratamento, a exposição a cádmio não afectou os conteúdos de Mg, P, Cu, Zn e B nas plantas, decresceu o conteúdo de K, e aumentou os níveis daquele metal pesado. O conteúdo de cálcio decresceu na porção aérea, enquanto o Fe decresceu e o Mn aumentou na raiz. Ao fim do mesmo período de tempo, a exposição a cádmio não afectou de um modo geral a acumulação dos micronutrientes nos *calli*, excepto o Mn cujo conteúdo aumentou. Os macronutrientes não foram afectados nos *calli* expostos a cádmio. Relativamente ao metabolismo da prolina verificou-se que este aminoácido se acumula preferencialmente nas folhas e *calli* de girassol. Esta acumulação é acompanhada dum incremento da actividade da OAT em plantas e *calli* e da P5Cr em *calli*, assim como um decréscimo da actividade da oxidase da prolina em plantas e *calli*. Verificou-se que existe uma relação traduzida por uma equação polinomial entre a concentração do cádmio no meio e a redução de peso seco ao fim de 21 dias. Verificou-se que os *calli* são mais resistentes que as plantas, dado que apresentam um  $\text{IC}_{50}$  de 494  $\mu\text{M}$  relativamente ao das plantas que é de 429  $\mu\text{M}$ . Registe-se finalmente, que a acumulação de cádmio nas plantas e nos *calli* é linear em função do aumento da concentração de cádmio no meio de cultura, sendo superior nas raízes, seguindo-se a porção aérea e finalmente os *calli*. Os resultados indicam assim que os *calli* são mais resistentes que as plantas, e esta resistência pode relacionar-se com um menor efeito exercido na acumulação de nutrientes, menor acumulação de cádmio nos tecidos, assim como num menor efeito na degradação membranar. O cádmio também afecta de maneira diferente o metabolismo da prolina nas plantas do que nos *calli*. É assim de aconselhar precaução quando em ensaios deste tipo se pretenderem extrapolar resultados obtidos em culturas *in vitro* relativamente ao comportamento da planta intacta.

## Abstract

Cadmium is one of the heavy metal the most pollutant, as it is highly accumulated in the environment. The aim of this work was to evaluate the effects of high concentrations of cadmium (5, 50 and 500  $\mu$ M) in sunflower (*Helianthus annuus* cv. SH222) growing hidroponically and in *calli* of the same genotype growing on solid MS medium. The evaluation of cadmium effects on plants and *calli* growth was done by comparing growth rates and by determining some parameters usually associated with senescence: chlorophyll content, photosynthetic efficiency, soluble protein content and membrane integrity, and water content. It was also analysed the effect of cadmium in the accumulation of macro and micronutrients in the different plant organs and in *calli*. Finally it was determined the effect of cadmium in the accumulation of proline, an aminoacid usually associated with stress situations, and in the activities of some enzymes involved in proline metabolism: P5Cr, OAT and proline oxidase.

High concentrations of cadmium decreased growth rates and shoot length as well as fresh and dry weighs of plants and *calli*. Cadmium also induced senescence in plants as it reduced photosynthetic efficiency, and chlorophyll content (up to the concentration of 50  $\mu$ M) as well as the content of soluble proteins. The exposure to high concentrations of cadmium also induced membrane degradation in plants. In *calli*, high concentrations of cadmium only affected fresh and dry weighs and decreased soluble protein contents.

After 21 days of treatment, the exposure to cadmium did not affect the contents of Mg, P, Cu Zn and B in plants, and it decreased the content of K and increased cadmium accumulation. Calcium content also decreased in shoots while Fe decreased and Mg increased in roots. Macronutrient contents (except Mn) were not affected in *calli* exposed to cadmium.

Proline accumulated at higher concentrations in leaves and *calli* of sunflower and its levels increased in cells exposed to cadmium. This accumulation is accompanied by an increase of OAT activity in plants and *calli* and of P5Cr in *calli*, while proline oxidase activity decreased in plants and *calli*.

There was a correlation (observed by a polinomial equation) between the cadmium concentration in the medium and the decrease of dry weigh after 21 days of treatment. *Calli* were more tolerant to cadmium as they exhibited an  $IC_{50}$  of 495  $\mu$ M respectively to plants that had an  $IC_{50}$  of 429  $\mu$ M. Finally, it can be observed that the increase of cadmium accumulation in roots, shoots and *calli* was linear, as a function of cadmium content in the medium. Roots accumulated more cadmium, followed by shoots and then by *calli*.

These results indicate that *calli* are more tolerant to cadmium than plants and that this resistance can be correlated probably with lower effects on nutrient accumulation, lower cadmium accumulation in tissues and also with lower membrane degradation. These results also show that cadmium had different effects on proline metabolism in *calli*. It should be advisable to be careful when one pretends to extrapolate results from assays of this kind obtained from *in vitro* cultures, to the behaviour of intact plants.

## Resumé

Le cadmium est un des métaux lourds le plus polluant, dû à sa forte accumulation dans l'environnement. Le but de ce travail était d'évaluer les effets de hautes concentrations de cadmium (5, 50 et 500  $\mu$ M) dans le tournesol (*Helianthus annuus* cv. SH222) cultivé en milieu hydroponique et dans les *calli* du même génotype qui grandit dans un milieu solide MS. L'évaluation des effets du cadmium sur la croissance des plantes et des *calli* a été faite en comparant les taux de croissance et en déterminant quelques paramètres habituellement associés à la sénescence: contenu des chlorophylles, efficacité photosynthétique, contenu des protéines solubles, intégrité de la membrane, et contenu hydrique. L'effet du cadmium a aussi été analysé sur l'accumulation des éléments macro et micro nutritifs dans les différents organes de la plante et dans les *calli*. Finalement l'effet du cadmium a été évalué sur l'accumulation de la proline, un aminoacide habituellement associé aux situations de stress, et sur les activités de quelques enzymes impliquées dans le métabolisme de la proline: P5Cr, OAT et oxidase de la proline.

Les hautes concentrations de cadmium ont diminué les taux de croissance et la longueur de la portion aérienne aussi bien que les poids frais et sec des plantes et *calli*. Le cadmium a aussi induit une sénescence dans les plantes tout comme il a réduit l'efficacité photosynthétique, le contenu des chlorophylles (jusqu'à la concentration de 50  $\mu$ M) mais aussi le contenu des protéines solubles. L'exposition à hautes concentrations de cadmium a aussi entraîné la déchéance de la membrane des plantes. Pour les *calli*, les hautes concentrations de cadmium ont seulement affecté les poids frais et sec et ont diminué le contenu des protéines solubles.

Après 21 jours de traitement, l'exposition au cadmium n'a pas affecté le contenu de Mg, P, Cu Zn et B dans les plantes, il a diminué le contenu de K et a augmenté l'accumulation du cadmium. Le contenu du calcium a aussi diminué dans les portions aériennes tandis que le Fe a diminué et le Mg a augmenté dans les racines. Le contenu des substances nutritives n'a pas été affecté dans les *calli* exposés au cadmium.

La proline s'est accumulée, en plus hautes concentrations, dans les feuilles et les *calli* de tournesol, son niveau a augmenté quand il est exposé au cadmium. Cette accumulation est accompagnée d'une augmentation de l'activité de OAT dans les plantes et les *calli*, et P5Cr dans les *calli*, tandis que l'oxidase de la proline a diminué dans les plantes et *calli*.

Une corrélation (observée par une équation polinomiale) existait donc entre la concentration du cadmium dans le milieu et la baisse du poids sec après 21 jours de traitement. Par rapport aux plantes qui ont une  $IC_{50}$  de 429  $\mu$ M, les *calli* se sont montrés plus tolérants au cadmium car la leur est de 495  $\mu$ M. Ainsi on a observé que l'augmentation d'accumulation du cadmium dans les racines, les tiges et les *calli* était linéaire, en fonction du contenu du cadmium dans le milieu. Les racines ont accumulé plus de cadmium, suivies des tiges puis des *calli*.

Ces résultats indiquent que ces *calli* sont plus tolérants au cadmium que les plantes et que cette résistance correspondrait, aux bas effets de l'accumulation nutritive, à une moindre accumulation de cadmium dans les tissus et aussi à une baisse de la déchéance de la membrane. Ces résultats nous ont montrés aussi que le cadmium avait des effets différents sur le métabolisme de la proline de la plante que sur celle des *calli*. Toutefois les résultats sont à manipuler avec prudence; en effet ceux obtenus en cultures *in vitro* ne doivent pas être entièrement extrapolés à ceux des plantes en milieu naturel.

## ABREVIATURAS

BAP –	6-Benzilaminopurina
CH –	Conteúdo hídrico
Cl <sub>a</sub> –	Clorofila a
Cl <sub>b</sub> –	Clorofila b
EDTA –	Ácido etileno-diamino tetracético
F <sub>0</sub> –	Fluorescência mínima (basal)
F <sub>m</sub> –	Fluorescência máxima
F <sub>v</sub> –	Fluorescência variável
GSA –	Semialdeído glutâmico
LAR –	Razão da área foliar
LWR –	Razão do peso foliar
MDA –	Malondialdeído
MS –	Murashige & Skoog
NAA –	Ácido ? naftilacético
NAD(H) –	Nicotiamida adenina dinucleótido
NAR –	Taxa de assimilação líquida
OAT –	Aninotransferase da ornitina
OP –	Oxidade da prolina
P.aérea -	Porção aérea
P5C –	Pirrolina-5-carboxilato
P5Cr –	Reductase da pirrolina-5-carboxilato
PF –	Peso fresco
PMSF –	Fenilmetanosulfonil
PS –	Peso seco
PSI –	Fotossistema I
PSII –	Fotossistema II
PVP –	Polivinilpirrolidona
RGR –	Taxa de crescimento relativo
TBA –	Ácido tiobarbitúrico
TCA –	Ácido tricloroacético
UV –	Ultravioleta

# ÍNDICE GERAL

## CAPÍTULO I – Introdução

1	O cádmio -----	17
1.1	Características e utilização -----	17
1.2	Acumulação de cádmio no ambiente -----	19
1.3	Influência de factores ambientais na disponibilidade de cádmio -----	20
2	O efeito do cádmio nas plantas -----	20
2.1	Influência do cádmio no crescimento de plantas -----	20
2.2	Influência do cádmio na senescência de plantas -----	22
2.3	Influência do cádmio no metabolismo da prolina -----	23
3	O girassol com planta modelo em estudos de toxicidade em metais pesados -----	25
3.1	A espécie <i>Helianthus annuus</i> L. -----	25
3.2	Importância histórica e económica -----	25
3.3	A utilização do girassol em estudos de toxicidade de nutrientes e metais pesados -----	26
3.4	A utilização de culturas hidropónicas vs culturas <i>in vitro</i> de girassol em estudos sobre o efeito do excesso de metais pesados em células vegetais --	27
	Objectivos gerais -----	27

## CAPÍTULO II - Material e Métodos

1	Culturas de <i>Helianthus annuus</i> L. -----	29
1.1	Cultura <i>in vitro</i> de <i>Helianthus annuus</i> L. -----	29
1.1.1	Germinação das sementes -----	29
1.1.2	Manutenção de plantas <i>in vitro</i> -----	29
1.1.3	Tratamento com cádmio -----	30
1.2	Cultura hidropónica de <i>Helianthus annuus</i> L. -----	30
1.2.1	Germinação das sementes -----	30
1.2.2	Manutenção das culturas hidropónicas e tratamento com cádmio -----	30

2	Estudo do crescimento de <i>calli</i> e plantas de <i>Helianthus annuus</i> L. -----	31
2.1	Determinação de parâmetros de crescimento-----	31
2.1.1	Aspecto de plantas e <i>calli</i> -----	31
2.1.2	Peso fresco de plantas e <i>calli</i> e comprimento de plantas -----	31
2.1.3	Peso seco e conteúdo hídrico de plantas e <i>calli</i> -----	32
2.1.4	Área foliar-----	32
2.1.5	Determinação de RGR, NAR, LAR, SLA e LWR -----	32
2.1.6	Determinação do IC <sub>50</sub> -----	33
3	Determinação de parâmetros de senescência -----	33
3.1	Determinação de conteúdo clorofilino -----	33
3.2	Determinação da eficiência fotossintética -----	34
3.3	Determinação do conteúdo em proteínas solúveis em <i>calli</i> e plantas de <i>Helianthus annuus</i> L. -----	34
3.4	Determinação do nível de peroxidação lipídica (MDA) -----	35
3.5	Determinação da osmolalidade dos tecidos-----	35
4	Análise de elementos inorgânicos -----	36
4.1	Análise de macro e micronutrientes-----	36
4.2	Análise de cádmio -----	37
5	Determinação da actividade enzimática e metabolismo da prolina-----	38
5.1	Determinação do teor em prolina e <i>calli</i> e plantas de girassol -----	38
5.2	Actividade da aminotransferase da ornitina (OAT; EC 2.6.11.3) -----	38
5.3	Actividade da reductase da pirrolina-5-carboxilato (P5Cr; EC 1.5.1.2) -----	39
5.4	Actividade da oxidase da prolina (OP; EC 1.4.3.1) -----	39
6	Tratamento estatístico-----	40

### **CAPÍTULO III - Resultados**

1	Aspecto externo de plantas e <i>calli</i> de <i>Helianthus annuus</i> L. -----	41
1.1	Aspecto das plantas-----	41
1.2	Aspecto dos <i>calli</i> -----	43
2	Determinação das taxas de crescimento-----	44
2.1	Comprimento da planta de <i>Helianthus annuus</i> L. -----	44



2.1.1	Comprimento da raiz	44
2.1.2	Comprimento da porção aérea	44
2.1.3	Razão raiz/porção aérea	45
2.2	Variação do peso fresco	45
2.3	Variação do peso seco	47
2.4	Conteúdo hídrico	48
2.5	Área foliar	49
2.6	RGR, NAR, LAR, SLA, LWR	49
2.7	IC <sub>50</sub>	51
3	Parâmetros de senescência	51
3.1	Conteúdo clorofilino	51
3.2	Eficiência fotossintética	52
3.3	Conteúdo em proteínas solúveis	53
3.4	Peroxidação lipídica (MDA)	55
3.5	Osmolalidade dos tecidos	56
4	Análise de elementos inorgânicos	57
4.1	Análise de macronutrientes	57
4.2	Análise de micronutrientes	61
4.3	Análise de cádmio	66
5	Determinação da actividade enzimática e metabolismo da prolina	67
5.1	Conteúdo em prolina	67
5.2	Actividade da aminotransferase da ornitina (OAT; EC 2.6.11.3)	69
5.3	Actividade da reductase da pirrolina-5-carboxilato (P5Cr; EC 1.5.1.2)	70
5.4	Actividade da oxidase da prolina (OP; EC 1.4.3.1)	72

## **CAPÍTULO IV - Discussão**

1	Parâmetros de crescimento e senescência	74
2	Desequilíbrios nutricionais	79
3	Metabolismo da prolina	82

<b>Conclusão</b>	86
------------------	----

<b>Bibliografia</b>	88
---------------------	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1 – Esquema representativo das vias metabólicas envolvidas na síntese de prolina. ....	24
Figura III.1– Aspecto das plantas de <i>Helianthus annuus</i> em culturas hidropônicas, colhidas após 15 dias de exposição a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M cádmio .....	41
Figura III.2 – Aspecto das folhas de plantas de <i>Helianthus annuus</i> L. expostas a concentrações crescentes de cádmio em cultura hidropônica, após 15 dias de tratamento. ....	42
Figura III.3 - Aspecto do tecido caloso de <i>Helianthus annuus</i> exposto a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M de cádmio após 15 dias de tratamento.....	43
Figura III.4 – Comprimento (cm) da raiz de <i>Helianthus annuus</i> aos 0, 8, 15 e 21 dias de exposição a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M de cádmio. ....	44
Figura III.5- Comprimento (cm) da porção aérea das plantas de <i>Helianthus annuus</i> , aos 0, 8, 15 e 21 dias de exposição a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M de cádmio. ....	45
Figura III.6 – Razão entre comprimento da raiz e porção aérea aos 0, 8, 15 e 21 dias de exposição a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M de cádmio. ....	45
Figura III.7 - Variação do peso fresco de <i>Helianthus annuus</i> em cultura hidropônica e <i>in vitro</i> sujeitos a tratamento com cádmio 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias .....	46
Figura III.8 - Variação do peso seco de <i>Helianthus annuus</i> em cultura hidropônica e <i>in vitro</i> sujeitos a tratamento com cádmio 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias .....	47
Figura III.9 - Variação do conteúdo hídrico de <i>Helianthus annuus</i> em cultura hidropônica e <i>in vitro</i> , sujeitos a tratamento com cádmio 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias .....	48
Figura III.10 - Variação da área foliar de <i>Helianthus annuus</i> exposto a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M de cádmio, ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias. ....	49
Figura III.11 – Efeito das elevadas concentrações de cádmio na taxa de crescimento relativo (RGR) de plantas de <i>Helianthus annuus</i> L. ao fim de 21 dias de exposição ao metal. ....	49
Figura III.12 – Efeito das elevadas concentrações de cádmio na taxa de assimilação líquida (NAR) e na razão da área foliar (LAR) de <i>Helianthus annuus</i> L. ao fim de 21 dias de exposição ao metal. ....	50
Figura III.13 – Efeito das elevadas concentrações de cádmio na área foliar específica (SLA) e na razão do peso foliar (LWR) de <i>Helianthus annuus</i> L. ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias de exposição ao metal. ....	50

Figura III.14 - Conteúdo clorofilino em folhas de plantas de <i>Helianthus annuus</i> expostas a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M de Cd ao fim de 21 dias de tratamento-----	51
Figura III.15 - Variação da Fluorescência basal em folhas de <i>Helianthus annuus</i> expostas a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias. -----	52
Figura III.16 - Variação da Fluorescência máxima em folhas de <i>Helianthus annuus</i> expostas a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias -----	53
Figura III.17 - Variação da Fluorescência variável em folhas de <i>Helianthus annuus</i> expostas a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias -----	53
Figura III.18 - Variação da razão Fluorescência variável/fluorescência máxima em folhas de <i>Helianthus annuus</i> expostas a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias. -----	53
Figura III.19 - Variação da concentração de proteínas solúveis em raízes de <i>Helianthus annuus</i> exposta a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8 e 21 dias -----	54
Figura III.20 - Variação da concentração de proteínas solúveis em caules de <i>Helianthus annuus</i> exposto a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8 e 21 dias. -----	54
Figura III.21 - Variação da concentração de proteínas solúveis em folhas de <i>Helianthus annuus</i> exposta a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8 e 21 dias -----	54
Figura III.22 - Variação da concentração de proteínas solúveis nos <i>calli</i> de <i>Helianthus annuus</i> exposta a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8 e 21 dias. -----	55
Figura III.23 - Acumulação de MDA nas folha e <i>calli</i> de <i>Helianthus annuus</i> ao fim de 21 dias de exposição a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M Cd. -----	55
Figura III.24 – variação da osmolalidade de raízes expostas a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M Cd, ao fim de 21 dias de exposição ao metal. -----	56
Figura III.25 – variação da osmolalidade das folhas expostos a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M Cd, ao fim de 21 dias de exposição ao metal. -----	56
Figura III.26 – variação da osmolalidade dos <i>calli</i> expostos a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M Cd, ao fim de 21 dias de exposição ao metal -----	56
Figura III.27 - Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M na variação da concentração de Mg em <i>Helianthus annuus</i> . -----	57
Figura III.28 - Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M na variação da concentração de K em <i>Helianthus annuus</i> . -----	58
Figura III.29 - Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M na variação da concentração de P em <i>Helianthus annuus</i> -----	59
Figura III.30 - Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M na variação da concentração de Ca em <i>Helianthus annuus</i> -----	60
Figura III.31 - Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M na variação da concentração de Fe em <i>Helianthus annuus</i> -----	61

Figura III.32 - Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M na variação da concentração de Zn em <i>Helianthus annuus</i> .....	62
Figura III.33 - Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M na variação da concentração de Cu em <i>Helianthus annuus</i> .....	63
Figura III.34 - Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M na variação da concentração de Mn em <i>Helianthus annuus</i> .....	64
Figura III.35 - Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500 $\mu$ M na variação da concentração de B em <i>Helianthus annuus</i> .....	65
Figura III.36 - Variação da concentração de Cd em <i>Helianthus annuus</i> .....	66
Figura III.37 – Relação entre a concentração de cádmio no meio de cultura e no meio intracelular (raiz, porção aérea e <i>calli</i> ) .....	67
Figura III.38 - Variação da concentração de prolina em <i>Helianthus annuus</i> exposta a 0, 5 e 500 $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8, e 21 dias .....	68
Figura III.39 – Efeito das elevadas concentrações de cádmio na variação da actividade da amino-transferase da ornitina (OAT) aos 0, 8 e 21 dias de exposição ao metal .....	70
Figura III.40 – Efeito das elevadas concentrações de cádmio na variação da actividade da reductase da pirrolina-5-carboxilato (P5Cr) aos 0, 8 e 21 dias de exposição ao metal. ....	71
Figura III.41 – Efeito das elevadas concentrações de cádmio na variação da actividade da Oxidase da prolina (OP) aos 0, 8 e 21 dias de exposição ao metal-----	72

## **INDICE DE TABELAS**

Tabela II.1 - Composição do meio de cultura Long Ashton (Adaptado de Meidner, 1984) ----- 24

Tabela II.2 - Limite de detecção e comprimento de onda utilizado para cada análise dos elementos, por ICP (Eugénio Soares, comunicação pessoal, 1998)----- 31



## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

São diversos os metais pesados que se podem acumular em águas ou no solo devido a processos naturais e/ou à actividade do Homem. A acumulação de alguns destes metais pesados tem atingido, contudo, em certas regiões, níveis preocupantes para o equilíbrio do ecossistema sendo, nestes casos, normalmente devido à acção do Homem. Parte desta preocupação advém do facto dos metais pesados serem elementos persistentes no solo, sendo assim extremamente difícil a sua remoção.

Neste grupo de metais salienta-se o cádmio, juntamente com outros como o crómio, cobalto, mercúrio, níquel, chumbo, ou alguns micronutrientes como o cobre, zinco ou o manganésio.

#### 1 O Cádmio

##### 1.1 Características e utilização

O cádmio foi descoberto no século XIX por Stromeyer quando, em 1817, isolou carbonato de cádmio ( $\text{CdCO}_3$ ) a partir de calamina (Fergusson, 1990). A sua produção é limitada pelo Zn, já que é obtido quase exclusivamente como um subproduto deste elemento (numa proporção média de 3-3.5  $\text{Kg}_{\text{Cd}}$  por 1000  $\text{Kg}_{\text{Zn}}$ ) (Azevedo, 1995). O cádmio é um metal de transição apresentando normalmente valência +2 ( $\text{Cd (II)}$ ). Apesar de ter uma reactividade semelhante à do zinco, o cádmio apresenta, contudo, maior tendência para formar ligações covalentes (especialmente com o enxofre) (Fergusson, 1990). Por outro lado, o sulfureto e o carbonato de cádmio são menos solúveis do que os sais de zinco, enquanto o hidróxido de cádmio é mais solúvel que o hidróxido de zinco (Ferreira, 1979 *vide* Azevedo, 1995). Para além disso, o cádmio pode formar uma série de complexos solúveis nomeadamente com cianetos e aminas.

A toxicidade deste metal foi referida já no século XIX, e tendo em conta esse aspecto, sais de cádmio foram usados até meados do século XX como antisépticos, acaricidas, nematocidas, etc. (Robards e Worsfold, 1991 *vide* Azevedo, 1995). Verdadeiras preocupações ambientais sobre o efeito do cádmio no ambiente surgiram



apenas na década de setenta do século XX tendo, a partir dessa data, vindo a verificar-se uma redução do seu uso. Por exemplo, na Alemanha o uso deste metal decresceu cerca de 40% só entre 1979 e 1981.

Contudo, sobretudo desde a segunda guerra mundial, o cádmio foi largamente usado na indústria durante muitos anos. Por exemplo, o cádmio tem sido usado no fabrico de:

- ? pigmentos que são usados em materiais tão diversos como plásticos, cerâmicas, têxteis, tintas de impressão, etc. São normalmente estáveis a elevadas temperaturas assim como a radiações UV, entre outros factores, o que apresenta vantagens ao nível industrial (Tosch, 1990 *vide* Azevedo, 1995);
- ? agentes anticorrosivos em superfícies como ferro, aço e ligas de cobre e alumínio através de banhos electrolíticos (cadmiagem electrolítica), e usado com este fim no revestimento de peças como parafusos, peças de automóveis e aviões, equipamento electrónico, etc. (Fergusson, 1990);
- ? ligas metálicas, do qual é componente. O cádmio entra por exemplo na composição de ligas de baixo ponto de fusão, soldas de prata, etc. (Ferreira, *vide* Azevedo, 1995);
- ? baterias, sobretudo as do tipo completamente seladas (com largo uso doméstico em rádios, brinquedos, etc.), mas cuja utilização está progressivamente a entrar em desuso (Tosch, 1990 *vide* Azevedo 1995).

Dado o seu impacto no ambiente, surge a necessidade de reduzir a utilização deste metal, procurando-se substitutos para algumas destas utilizações (como o uso de pigmentos orgânicos que podem substituir os de cádmio), ou ainda, programas eficazes de reciclagem/reutilização de material contendo cádmio (por exemplo ao nível das baterias de níquel e cádmio). Contudo, e para além dos focos de contaminação descritos anteriormente, existem ainda outras fontes de contaminação ambiental altamente importantes e dos quais se destacam como exemplos: a) a extracção e enriquecimento de minério de zinco e as refinarias metalúrgicas; b) a incineração de sucatas e outros materiais contendo Cd; c) a produção de materiais à base de cádmio (como os pigmentos referidos anteriormente), d) a utilização de fertilizantes fosfatados, produzidos a partir de rochas fosfatadas, e nos quais o Cd pode surgir como contaminante (Dana, 1984 *vide* Azevedo, 1995), e de lamas residuais provenientes de estações de tratamento de águas residuais, que podem contribuir para contaminação de solos agrícolas. A contaminação do solo ocorre a longo prazo, a partir da utilização persistente destes adubos e consequente acumulação de cádmio no solo (e futuro arrastamento para as águas). Como exemplo da importância dos adubos fosfatados na



contaminação no solo, cite-se Williams e David (1976) que referem que, em média, 80% do cádmio adicionado com o adubo fosfatado permanece nos primeiros 7,5 cm de solo durante um período de 20 anos.

## 1.2 Acumulação de cádmio no ambiente

Como a generalidade dos metais pesados, o cádmio apresenta uma elevada persistência no ambiente, o que contribui para a sua bioacumulação nos seres vivos (Robards e Worsfold, 1991 *vide* Azevedo, 1995). Por exemplo, em águas profundas dos oceanos o seu tempo de residência está estimada entre os 7 000-250 000 anos, enquanto em solos pode permanecer durante 280 anos. Em contrapartida, no ser humano o cádmio tem uma semi-vida de 30 anos (Robards e Worsfold, 1991 *vide* Azevedo, 1995; Fergusson, 1990).

Durante o período de tempo que o cádmio fica no solo, a solubilidade e consequente disponibilidade deste metal para as plantas depende de inúmeros factores como, por exemplo: a concentração do metal; a especiação química que apresenta e, por sua vez, a proporção das espécies químicas que dependem, pelo menos em parte, das condições ambientais tais como pH e potencial redox (Fergusson, 1990); a capacidade de troca com outros catiões; a concentração de outros metais e/ou nutrientes; a textura e composição do solo, etc. (Greger, 1999). Por exemplo, um pH ácido pode aumentar a disponibilidade de catiões como o  $\text{Cd}^{2+}$  (uma vez que os iões de  $\text{H}^+$  podem ter mais afinidade para os aniões que constituem os colóides) enquanto uma grande riqueza em matéria orgânica pode aumentar a imobilização destes (Greger, 1999).

O limite para a concentração de Cd em solos não contaminados deverá situar-se abaixo de 0,5 ppm, mas pode atingir valores de 3 ppm dependendo das características do solo (Hagemeyer, 1999). Em contrapartida, a concentração média de Cd nas plantas situa-se entre 0,05 e 0,2 ppm, podendo no entanto atingir valores muito mais elevados em solos contaminados (Hagemeyer, 1999).

## 1.3 Influência de factores ambientais na disponibilidade de cádmio

A interacção com nutrientes minerais pode ser importante para a biodisponibilidade do metal. Por exemplo a absorção de Cd por raízes de várias espécies foi reduzida na presença de outros catiões (Greger, 1999). Um dos catiões mais





estudados foi o Ca, mas de acordo com este autor, não há, contudo, dados conclusivos sobre a influência por exemplo do Ca na absorção de Cd. Por exemplo, em beterraba não se registou qualquer influência entre a assimilação de Cd na presença de concentrações crescentes de Ca (Greger e Bertell, 1992 *vide* Greger, 1999), enquanto a acumulação de Cd aumentou em videira e decresceu em plantas de *Salix* sp. e de ervilheira na presença de Ca (Greger, 1999).

Outros factores como a luz ou a temperatura também podem ser importantes. Por exemplo, um aumento de intensidade luminosa levou ao aumento de assimilação de Cd por algas, líquenes e musgos (Greger, 1999). Também o aumento de temperatura levou ao aumento de assimilação e acumulação deste metal em *Solanum nigra*, *Lemna minor* e ainda em *Lolium perenne* (Greger, 1999). Estes efeitos não parecem ser, contudo, universais, pois o aumento de intensidade luminosa parece ter diminuído a acumulação de Cd em raízes de pinheiro quer a 15 como a 20°C (Greger, 1999).

## **2 O efeito de cádmio nas plantas**

### **2.1 Influência do cádmio no crescimento das plantas**

Para além das características do metal e do solo, as características da planta também influenciam a absorção de metais por parte das plantas. Por exemplo, a área de absorção radicular influencia a absorção de Cd, sendo em geral mais eficaz a absorção, quanto maior for a dimensão da raiz (Greger, 1999). No entanto, apesar do aumento de absorção, a concentração por grama de tecido fresco pode diminuir com o aumento da massa radicular (Greger, 1999). Por outro lado, se várias plantas estão a crescer numa área limitada, o aumento das dimensões das raízes pode levar à competição pelo metal, podendo interferir com a capacidade de absorção de Cd pelas raízes (Greger, 1999).

Dada a dificuldade dos metais pesados em atravessar a endoderme com vista a atingirem o xilema da raiz, o Cd (assim como outros metais pesados) é sobretudo absorvido por raízes jovens onde a formação da endoderme ainda está incompleta (Greger, 1999).

A translocação do Cd é muito baixa, e sobretudo acrópta, tendo sido provado em plantas de ervilheira após pulverização foliar, que a sua translocação basípta é praticamente nula (Greger, 1999). Na translocação, a formação de complexos com ácidos orgânicos, aminoácidos, etc., parece ter um papel importante (Greger, 1999). Dada a baixa taxa de translocação deste metal, e por outro lado uma grande



capacidade de adsorção às paredes, é natural que se acumule predominantemente (75-90%) nas raízes (Greger, 1999).

Não se conhece, até hoje, qualquer papel que o Cd possa desempenhar nas plantas, sendo contudo bem conhecido o seu carácter tóxico nas mesmas (e.g. Jackson *et al.*, 1990; Hagemeyer, 1999). Para além da taxa de mortalidade, a abordagem mais simples e mais comum para definir o grau de toxicidade deste metal nas plantas é o estudo da correlação entre a absorção/acumulação de Cd e a taxa de crescimento dessas plantas (e.g. crescimento, peso fresco, peso seco). Por exemplo, o crescimento de raízes em várias plantas monocotiledóneas (*Zea mays*, *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*) e diversas dicotiledóneas (*Vigna angularis*, *Lycopersicon esculentum*, *Cucumis sativa*, *Raphanus sativus*, *Pisum sativum*, *Lactuca sativa*, *Sesamum indicum*) expostas a Cd em cultura hidropónica, demonstrou que as primeiras eram bastante mais tolerantes, sobrevivendo a níveis como 60  $\mu$ M Cd.

Dada a sua natureza, no que diz respeito à imobilidade, as plantas têm de se adaptar a situações de toxicidade. Na relação planta/Cd, poder-se-á aplicar a classificação das plantas definida por Baker (1981) e baseada na relação entre o nível de metal no solo e o seu conteúdo na porção aérea: plantas acumuladoras são as que acumulam grandes quantidades de metais pesados na porção aérea; plantas indicadoras são aquelas cuja assimilação e translocação dos metais é regulada de maneira que a concentração interna reflecte os níveis do metal no exterior; finalmente plantas excludoras são aquelas que, mesmo na presença de elevados níveis de metal, mantêm os níveis deste baixos na porção aérea (Baker, 1981 *vide* Prasad e Hagemeyer, 1999). Contudo, a classificação das plantas nestas três categorias pode ser complexa.

Na literatura estão descritos alguns efeitos do cádmio (assim como de outros metais pesados) em plantas, nomeadamente na taxa de crescimento (traduzida por decréscimos de comprimento, ou pesos fresco e/ou seco) (Azevedo, 1995; Hagemeyer, 1999) ou na nutrição mineral (Azevedo, 1995). Tem sido referida não só a competição do Cd com o Zn e Cu durante a absorção (Greger, 1999) como a sua interferência com outros micronutrientes, nomeadamente como o Mo e o Fe (Dietz, 1999). Esta interferência poderá ser a potencial responsável pela influência que o Cd exerce em muitas enzimas que usam estes micronutrientes como cofactores (Dietz, 1999).

## 2.2 Influência do cádmio na senescência das plantas



O Cd provoca alterações nas plantas a nível estrutural, bioquímico, fisiológico e molecular. Estas perturbações, induzidas pelo stress causado pela presença do metal pesado, podem reflectir-se nas plantas sob a forma de perturbações de crescimento e indução de senescência (Quirino *et al.*, 2000).

O Cd afecta a síntese da clorofila provavelmente por interferir com a redução de protoclorofilideo (Stobart *et al.*, 1985 *vide* Jackson *et al.*, 1990). Estes autores também propõem que este metal pode substituir alguns micronutrientes no processo da cadeia transportadora de electrões (Prazad e Strazalka, 1999), nomeadamente na plastoquinona, no complexo de cisão da água no LHCII, podendo ainda interferir com a ATPase (Jackson *et al.*, 1990; Neumann *et al.*, 1989). Uma das formas de medir estes efeitos na cadeia de fotofosforilação é através da medição da fluorescência das clorofilas. A intensidade da fluorescência *in vivo* é determinada pela intensidade da luz de excitação, pela fracção desta energia que é canalizada para o PSII, pela taxa de conversão de energia ao nível do centro de reacção do PSII, pela extensão da dissipação sob a forma de calor da energia de excitação e pela extensão da transferência de energia entre os dois fotossistemas (Lichtenthaler, 1988 *vide* Prasad e Hagemeyer, 1999). Esta medição concentra-se em dois componentes constantes e um variável. Os componentes constantes são a fluorescência basal ou mínima ( $F_0$ ), que é a fluorescência medida quando os centros de reacção se encontram abertos e a fluorescência máxima ( $F_m$ ), que é a fluorescência medida quando todos os centros de reacção se encontram fechados. A componente variável é a fluorescência variável ( $F_v$ ), a qual é determinada pelo estado do centro de reacção (aberto, ou fechado), e é definida como a diferença entre  $F_m$  e  $F_0$ . Para além da interferência no processo de fotofosforilação, o Cd parece também interferir com enzimas envolvidas na fotossíntese nomeadamente a rubisco em *Hordeum vulgare* (Stiborova *et al.*, 1986 *vide* Prasad e Strazalka, 1999), assim como a NADP-desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato em *Cajanus cajan* (Sheoran *et al.*, 1990 *vide* Prasad e Strazalka, 1999).

Para além da fluorescência, a variação da concentração dos pigmentos fotossintéticos e, nomeadamente das clorofilas, também é um parâmetro importante na avaliação de senescência de plantas. Alterações no teor de clorofila foram observadas por vários autores em plantas superiores expostas a metais pesados (Dietz *et al.*, 1999; Prasad e Strazalka, 1999). A redução ou incremento no teor de clorofila, degradação de clorofila a e b, etc. são reacções observadas como consequência do efeito de diferentes poluentes.

Outros parâmetros frequentemente usados na avaliação de senescência das plantas prendem-se com a integridade membranar. Um dos aspectos mais frequentemente associados à senescência é a peroxidação lípidica em que a presença



de radicais livres (produzidos em resposta ao stress induzido pelo metal) atacam as membranas, desde o tonoplasto e plasmolema (podendo levar a desequilíbrios osmóticos) até membranas plastidiais ou mitocondriais, afectando assim o processos fotossintético e respiratório, etc. Também durante a senescência, a proteólise intensifica-se, podendo levar a degradação de proteínas à acumulação de aminoácidos. Em situações de stress é assim de esperar um decréscimo do conteúdo de proteínas solúveis.

O Cd interfere ainda noutros processos metabólicos extremamente importantes, nomeadamente no metabolismo respiratório (provavelmente por interferir/substituir alguns micronutrientes como cofactores de certas enzimas, Jackson *et al*, 1990), assim como induz a síntese de fitoquelatinas, mas cuja abordagem sai fora do âmbito deste trabalho.

### 2.3 Influência do cádmio no metabolismo da prolina

A prolina tem sido considerada como sendo um aminoácido osmorregulador e protector em condições de stress (Kuznetsov e Shevyakova, 1999; Santos *et al.*, 2001). Vários autores têm descrito, um aumento dos níveis de prolina em situações de stress hídrico ou salino (Madan *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 2001; Sudhakar *et al.*, 1993). Contudo pouco se sabe sobre o comportamento da prolina perante concentrações elevadas de metais pesados. Costa e Spitz (1997) referem uma maior acumulação de prolina em culturas *in vitro* de *Lupinus albus* expostas a elevadas concentrações de cádmio. Por sua vez, Ali *et al.* (1998) mostraram que o stress de cobre induziu a acumulação de prolina em *Bacopa monniera*.

Nas plantas superiores, a prolina é sintetizada por duas vias metabólicas diferentes: directamente no citosol, a partir do glutamato e na mitocôndria a partir da ornitina (Figura 1.1). A via metabólica do glutamato tem sido largamente estudada e sabe-se que as plantas sob condições de stress osmótico sintetizam prolina através da redução do glutamato pela sintetase da  $\gamma^1$ -pirrolina-5-carboxilato em semialdeído- $\gamma$ -glutâmico (GSA) que é convertido em  $\gamma^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C) e cuja redução a prolina é feita pela P5Cr (Savouré *et al.*, 1995). Contudo, a acumulação de prolina sob condições de stress pela via da ornitina, parece não estar ainda bem elucidada. Julga-se que a ornitina é transformada em pirrolina-5-carboxilato por acção da aminotransferase da ornitina, e finalmente aquele composto é reduzido pela reductase da pirrolina-5-carboxilato (P5CR) em prolina (Madan *et al.*, 1995).

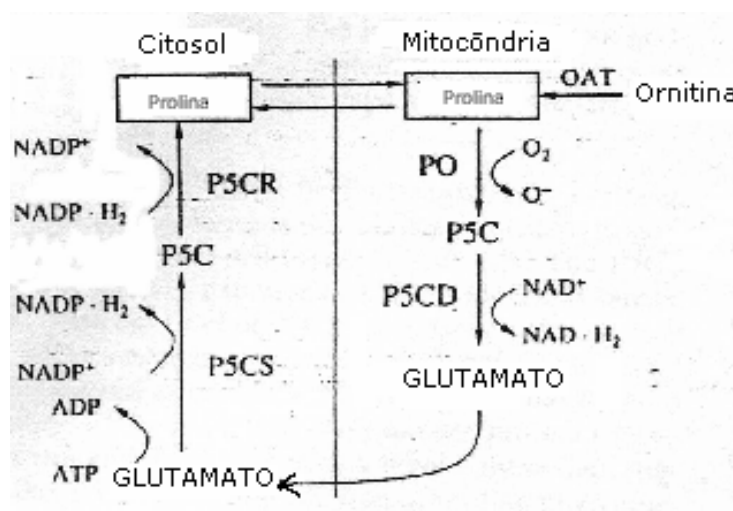


Figura 1.1 - Esquema representativo das vias metabólicas envolvidas na síntese de prolina. (adaptado de Kuznetsov e Shevyakova, 1998).

Contrariamente ao sistema enzimático envolvido no stress oxidativo que tem sido alvo de alguns estudos, os mecanismos envolvidos no metabolismo da prolina têm sido pouco abordados em plantas expostas a cádmio. Trabalhos preliminares com esta cultivar mostraram que quando plantas e *calli* são sujeitos a stress salino sofrem um aumento de níveis de prolina assim como um aumento de actividade da redutase da pirrolina-5-carboxilato e da aminotransferase da ornitina (OAT) (Santos *et al.*, 2001).

O estudo da via metabólica da degradação da prolina nas plantas tem grande importância visto que a sua acumulação tem sido associada a respostas a situações de stress e/ou resistência e pode resultar do distúrbio das vias de síntese ou catabolismo. Neste trabalho iremos estudar o comportamento de uma enzima envolvida na degradação deste aminoácido: a oxidase da prolina (OP) que leva à oxidação da prolina e ainda de duas enzimas relacionadas com a síntese desta aminoácido: a aminotransferase da ornitina (OAT) e da reductase da pirrolina-5-carboxilato (P5Cr).

### 3 O girassol como planta modelo em estudos de toxicidade de metais pesados.



### 3.1 A espécie *Helianthus annuus* L.

O girassol (*Helianthus annuus* L.) pertence ao género *Helianthus* que se integra na família das Asteraceae e que engloba cerca de 67 espécies. O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma planta anual tendo um sistema radicular constituído pela raiz principal e raízes laterais que crescem, inicialmente, paralelamente ao solo. Dado o seu grande poder de penetração, o sistema radicular do girassol permite que a planta tenha uma grande capacidade de adaptação a diversas condições de solo e clima (Sampaio, 1992).

Normalmente as cultivares comerciais são não ramificados, e apresentam folhas grandes, vilosas e largamente pecioladas, com disposição oposta nos dois primeiros pares de folhas e alterna em seguida (Pereira Coutinho, 1939). A forma das folhas varia ao longo dos nós da planta (Sampaio, 1992). A inflorescência é formada por dois tipos de flores: as marginais, assexuadas, e as do disco central, tubulosas e hermafroditas, dispostas em espiral do centro para a periferia (Pereira Coutinho, 1939). O seu fruto tem entre 7,5 a 17 mm de comprimento, sendo normalmente de cor branca, castanha ou negra, ou podendo ainda ser listrado (Sampaio, 1992).

### 3.2 Introdução histórica e importância económica

Numa revisão, Sampaio (1992) data a introdução do girassol na Europa, no século XVII, proveniente da América Latina, provavelmente do Perú (onde era cultivado pelos índios). Contudo, ao longo dos anos, esta planta impôs-se como fonte de óleos e planta de forragem. Actualmente a sua cultura alastra a todo o mundo, contando-se a Argentina, China, Estados Unidos da América e a Rússia como os países mais produtores (Santos, 1998). Na Europa, a sua cultura ocorre principalmente na Europa Central e do Sul (Sampaio, 1992), sendo actualmente uma oleaginosa de enorme importância económica não só devido à riqueza em óleos linoléico e oléico (Filipescu e Stoenescu, 1981), mas também devido à sua riqueza em proteínas, cálcio, ferro e fósforo, e em vitaminas (tiamina, riboflavina, ácido pantoténico e ácido nicotínico) (Boni *et al.*, 1981).

Para além da importância na alimentação, o girassol tem ainda aplicações noutras áreas como a indústria química (tintas e vernizes), forragem (tegumento dos aquénios, as folhas e os capítulos) (Sampaio, 1992) ou ainda na medicina popular.

Em Portugal, a cultura de girassol tem adquirido grande importância económica, e predomina no Alentejo (Beja, Évora e Elvas).

Dada a sua importância económica, o girassol tem sido sujeito a inúmeros estudos quer de selecção de genótipos mais produtivos, quer de selecção de genótipos que apresentem maior resistência a factores bióticos ou abióticos (e.g. microorganismos,



secura, etc.). Tendo em conta esta importância, a FAO criou em 1975 um Centro de Coordenação para investigação desta oleaginosa cujo principal objectivo é apoiar e divulgar investigações aplicadas no domínio da cultura do girassol com vista a aumentar a sua produção (Santos, 1998).

### **3.3 A utilização do girassol em estudos de toxicidade de nutrientes e metais pesados**

O girassol tem sido utilizado frequentemente como espécie modelo em estudos em laboratório sobre o efeito da toxicidade de diversos elementos nas plantas, ou em culturas *in vitro*. Citam-se exemplos sobre a toxicidade de alguns sais como o KCl (Santos *et al.*, 2001), NaCl em plantas e *calli* (e.g. Santos e Caldeira 1999). Por outro lado, folhas desta espécie foram também usadas para estudar taxas de adsorção de ferro, cobre, e cádmio e o seu efeito sobre algumas enzimas (Gallego *et al.*, 1996 *vide* Dietz *et al.*, 1999). O girassol foi também usado em estudos sobre o efeito do níquel no metabolismo do azoto (Gerandas e Sattelmacher, 1997 *vide* Hagemeyer, 1999).

Têm sido poucos os estudos sobre o efeito do Cd no girassol. Salientem-se, por exemplo, os trabalhos de Prazad e Strazalka (1999), em que plantas de *Helianthus annuus*, L. foram tratadas com Cd verificando-se um decréscimo do conteúdo clorofilino, ou ainda o trabalho de Gallego *et al.* 1996 (*vide* Dietz *et al.*, 1999) em que folhas desta espécie foram sujeitas a concentrações crescentes de Cd. Dado que sementes desta espécie são uma das maiores fontes de óleo para a alimentação, e dado que esta planta é uma importante forrageira para os animais, será importante saber mais aprofundadamente qual o comportamento desta planta a situações de excesso de metais pesados, nomeadamente o Cd. Por outro lado, e dado que o género *Helianthus* foi aconselhado por Saxena (1999) em programas de fitorremediação para alguns metais pesados, será também importante saber se o girassol se revela uma espécie acumuladora.

Finalmente, ressalte-se que ultimamente tem-se dado grande atenção aos níveis de Cd nas plantas consumidas pelo Homem e disponíveis no mercado (para revisão ver Azevedo, 1995). A maioria dos valores encontrados até ao momento são inferiores aos permitidos pela FAO/OMS mas não são isentos de preocupação dada a natureza cumulativa deste metal pesado (Azevedo, 1995).



### **3.4 A utilização de cultura hidropónica vs. cultura *in vitro* de girassol em estudos sobre o efeito do excesso de metais pesados em células vegetais**

O grande número de estudos que têm sido realizados sobre a toxicidade de Cd (entre outros metais) nas plantas reflecte em parte a grande importância (sobretudo ambiental) de que este tema se reveste. Inúmeros estudos sobre o excesso de Cd em plantas têm sido efectuados em estufa em culturas em meio sólido como terra (e.g. Azevedo, 1995; Greger *et al.*, 1995; Radoti *et al.*, 2000) ou em culturas hidropónicas (e.g. Chaoui *et al.*, 1997; Greger *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 1998).

Mais recentemente, a avaliação de toxicidade do Cd foi alargada a culturas de células *in vitro* (e.g. Toppi *et al.*, 1998). Esta abordagem reveste-se de grandes vantagens sobretudo porque: a) permite estudar a possibilidade de seleccionar linhas resistentes e/ou hiperacumuladoras que possam vir a ser posteriormente usadas por exemplo em programas de recuperação; b) permite estudar o efeito em células desdiferenciadas e expostas directamente ao excesso de Cd; c) permite ainda a manipulação genética das células com vista a melhorar a tolerância a este metal (em espécies cuja cultura *in vitro* e regeneração de plantas já foi bem estabelecida) nomeadamente para a cultivar usada neste trabalhos.

## **Objectivos gerais**

Pretendeu-se com este trabalho verificar o comportamento de plantas de girassol em cultura hidropónica e de *calli in vitro* quando expostos a concentrações crescentes de nitrato de cádmio, através da análise de parâmetros de crescimento, entre outros, e de parâmetros frequentemente utilizados na avaliação da senescência de células vegetais.

Os parâmetros indicadores de senescência mais usados na avaliação da toxicidade de metais pesados são em geral, e para além da taxa de crescimento e aspecto dos tecidos (e.g. Ferreira *et al.*, 1999), o conteúdo de proteínas solúveis (e.g. Lutts *et al.*, 1996), o conteúdo (e.g. Stobart *et al.*, 1985) e fluorescência de clorofilas (e.g. Krupa e Moniak, 1998;; Larsson *et al.*, 1998; Polit e Baszynski, 1997) e a peroxidação lipídica de membranas (e.g. Lutts *et al.*, 1996).

Outra forma de avaliar o efeito do cádmio passa por verificar a existência de desequilíbrios nutricionais (Larsson *et al.* 1998) bem como a alteração de vias metabólicas tais como a da prolina, frequentemente usada como biomarcador de stress





(para revisão ver Kuznetsov e Shevyakova, 1998). Mediante a análise destes parâmetros espera-se não só caracterizar esta espécie *ex vitro* e *in vitro* relativamente à sua resistência ao stress induzido por cádmio como ainda abrir perspectivas num futuro próximo, para a selecção, e regeneração de células resistentes com vista a posteriormente estudar a sua capacidade de aclimação a condições *ex vitro* e a condições adversas.



## CAPÍTULO II

### MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. Culturas de *Helianthus annuus* L.

##### 1.1 Cultura *in vitro* de *Helianthus annuus* L.

Toda a metodologia relativa à germinação de sementes e subcultura de explantes de girassol foi realizada numa câmara de fluxo laminar a fim de manter as condições de assépsia exigidas ao processo. O material de vidro e metálico bem como os meios de cultura utilizados foram previamente esterilizados por autoclavagem durante 30 e 20 minutos respectivamente.

###### 1.1.1 Germinação das sementes

Utilizaram-se aquénios de *Helianthus annuus* L. (fornecidos pela SCLEPAL, Elvas, Portugal) da cultivar SH222, os quais foram previamente esterilizados: após embebição em água destilada durante 15 minutos, as sementes foram desinfectadas numa solução (1:1) de  $H_2O_2$  a 30% e etanol absoluto, durante um período de 15 minutos e sob agitação. Após este tempo, as sementes foram lavadas, cerca de 3 vezes, em água destilada estéril durante 10 minutos. No final procedeu-se à desinfeção em 0,1% (m/v) de Benlate (fungicida).

As sementes depois de esterilizadas foram transferidas para meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) com redução para metade da concentração de nutrientes minerais, sem fitorreguladores nem vitaminas, com suplemento de 5 g/L de sacarose e 7 g/L de agar e com pH ajustado a 5,7. Após a germinação, as plântulas obtidas, foram usadas como fonte de explantes primários para obtenção de tecido caloso.

###### 1.1.2. Manutenção de plantas *in vitro*

Retiraram-se explantes de cotilédones de plântulas com 8 dias de idade, e foram plaqueados em caixas de Petri (cerca de 4 a 5 explantes por placa) contendo cerca de 35 mL de meio MS com suplemento de 30 g/L de sacarose, 200 mg/L de caseína hidrolisada, 4 g/L de PVP e as fitorreguladores NAA e BAP a 0,5 mg/L. Os meios foram gelificados com 7 g/L de agar e o pH ajustado a 5,7. O tecido caloso foi mantido em meio MS, a uma temperatura de  $\pm 20$  °C, com um fotoperíodo de 16 horas de luz



fornecida por lâmpadas fluorescentes com uma intensidade luminosa média de  $98 \pm 2 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , sendo renovado quinzenalmente.

#### 1.1.3. Tratamento com cádmio

Grupos de *calli* com um mês de idade ( $n = 30$ ) foram transferidos para meios de cultura de composição idêntica à referida anteriormente mas contendo  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  nas concentrações de 0, 5, 50 e 500  $\mu\text{M}$  de Cd.

A cultura decorreu durante um período de 21 dias à temperatura de  $20^\circ\text{C}$  com um fotoperíodo de 16 horas de luz fornecida por lâmpadas fluorescentes com uma intensidade luminosa média de  $98 \pm 2 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

### 1.2 Cultura Hidropónica de *Helianthus annuus* L.

#### 1.2.1 Germinação das sementes

Após embebição em água corrente durante cerca de 6 horas, os aquénios de *Helianthus annuus* (fornecidos pela SCLEPAL, Elvas, Portugal) foram desinfetados em lixívia a 20% durante 10 minutos, e seguidamente lavados abundantemente em água destilada. Colocaram-se as sementes em caixas de plástico devidamente limpas e desinfetadas com etanol a 70%, sobre papel absorvente embebido em água para manter um nível de hidratação suficiente à germinação dos aquénios.

#### 1.2.2 Manutenção da cultura hidropónica e tratamento com cádmio

As plântulas germinadas com 7 dias de idade foram divididas em 4 grupos ( $n=50$ ) e colocadas em caixas de plástico com arejamento, em meio de cultura de Long Asthon (Meidner, 1984; Tabela 1) ao qual se adicionou respectivamente  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  nas concentrações de 0, 5, 50 e 500  $\mu\text{M}$  de Cd. A cultura manteve-se durante 21 dias em estufa climatizada à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e sujeita a um fotoperíodo de 16 horas de luz fornecida por uma combinação de lâmpadas fluorescentes e tungsténio com uma intensidade luminosa média de  $102 \pm 1 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . O meio de cultura foi arejado e renovado semanalmente.



Tabela II.1 - Composição do meio de cultura Long Ashton (Adaptado de Meidner, 1984)

Sais minerais	Conc. (mg/L)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	790.000
$\text{KNO}_3$	342.000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.000
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	260.000
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	4.800
$\text{FeCl}_3$	2.500
$\text{H}_3\text{BO}_3$	7.150
$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.550
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.200
$\text{MnSO}_4$	2.540
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.226
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.126
pH	5.5

## 2 Estudo do crescimento de *calli* e plantas de *Helianthus annuus* L.

### 2.1 Determinação de parâmetros de crescimento

#### 2.1.1 Aspecto de plantas e *calli*

A análise do aspecto geral das plantas incidiu essencialmente na coloração das folhas e da raiz, assim como na altura da porção aérea e comprimento das raízes. Estas análises foram efectuadas aquando das colheitas aos 0, 8, 15 e 21 dias de exposição ao  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  a 0, 5, 50 e 500  $\mu\text{M}$  Cd. Foi feita também a análise da cor, friabilidade, fenolização, etc., dos *calli* expostos ao cádmio.

#### 2.1.2 Peso fresco de plantas e *calli* e comprimento das plantas

Para análise da taxa de crescimento, tanto as plantas como o tecido caloso obtidos foram pesados (PF) periodicamente aos 0, 8, 15 e 21 dias de sujeição ao



stresse de Cd. Utilizaram-se 6 plantas por cada tratamento com cádmio de 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M ( $n=6$ ) e 5 réplicas de *calli* ( $n=5$ ).

Para além da determinação do peso fresco, mediu-se ainda o comprimento da raiz e porção aérea, assim como a área foliar nas plantas tratadas com Cd.

#### 2.1.3 Peso seco e conteúdo hídrico de plantas e *calli*

As plantas bem como os *calli* obtidos durante e após o tratamento com Cd foram colocados na estufa a 60° C durante o tempo suficiente para a estabilização do peso. No final registou-se o peso seco (PS) da raiz, caule e folhas de plantas bem como dos *calli* obtidos aos 0, 8, 15 e 21 dias de sujeição ao nitrato de cádmio. Para as plantas utilizou-se um  $n=6$  e para os *calli*  $n=5$ .

Para cada amostra de raiz, caule, folha e de tecido caloso de *Helianthus annuus* L., o teor em água (%) foi calculado a partir da relação entre o peso fresco e o peso seco segundo a fórmula:

$$\text{Conteúdo hídrico (\%)} = \frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{\text{Peso fresco}} \times 100$$

#### 2.1.4 Área Foliar

Dos 4 grupos de plantas sujeitas aos diferentes tratamentos com cádmio (0, 5, 50 e 500  $\mu$ M), seleccionaram-se 6 réplicas ( $n=6$ ) de cada. Destas últimas recolheram-se, ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias, as folhas cujos contornos foram desenhados em papel milimétrico e medida a sua área com ajuda de um planímetro digital (Haff).

#### 2.1.5 Determinação de RGR, NAR, LAR, SLA e LWR

Com base nos valores obtidos para a aérea foliar em cada conjunto de plantas tratadas com 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M de Cd assim como do peso seco total e foliar, foram calculados os parâmetros: taxa de crescimento relativo (RGR), taxa de assimilação líquida (NAR), razão de área foliar (LAR), área foliar específica (SLA) e razão de peso foliar (LWR), (Wignarajah, 1990), de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{RGR} = (\ln \text{Ps}_{t_2} - \ln \text{Ps}_{t_1}) / t_2 - t_1$$



Depois de verificado a correlação existente entre a área foliar e o peso seco ( $R^2 > 0.97$ ) foi então possível calcular os restantes parâmetros<sup>1</sup>:

$$NAR = [(P_{St2} - P_{St1}) / (A_{t2} - A_{t1})] \times [(\ln A_{t2} - \ln A_{t1}) / t_2 - t_1] \quad g \cdot cm^{-2} \cdot d^{-1}$$

$$\overline{LAR} = [(A_1 / P_{s1}) + (A_2 / P_{s2})] / 2 \quad cm^2 \cdot g^{-1}$$

$$SLA = A / P_{sf} \quad cm^2 \cdot g^{-1}$$

$$LWR = P_{sf} / P_s$$

#### 2.1.6 Determinação de IC<sub>50</sub>

A partir dos dados relativos ao peso seco total das plantas e *calli* de girassol expostos a cádmio foram determinadas as curvas de crescimento a partir das quais foi possível deduzir o valor de IC<sub>50</sub>. Este valor representa a concentração de cádmio necessária para provocar a redução ou inibição do crescimento em 50 % em função do peso seco total.

### 3 Determinação de parâmetros de senescência

#### 3.1 Conteúdo clorofilino

A extracção e doseamento de clorofilas **a** e **b** das folhas de *Helianthus annuus* L. foram baseados no método de Arnon (1949). Ao fim dos 21 dias de tratamento com Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, para cada amostra (relativo a cada tratamento com Cd a 0, 5, 50 e 500 µM), pesou-se cerca de 0,5 g de folhas que foram homogeneizadas em 7 mL de acetona a 80%. O homogeneizado obtido, depois de agitado violentamente, foi centrifugado a 2000 g durante 5 minutos. Recolheu-se o sobrenadante para tubos de ensaio ao abrigo da luz e ao sedimento adicionou-se mais 3 mL de acetona a 80% para nova centrifugação a 2000 g durante 5 minutos. No final adicionou-se o sobrenadante obtido ao recolhido da primeira centrifugação.

A quantificação das clorofilas foi feita por espectrofotometria (espectrofotómetro Beckman DV 68) com leitura da densidade óptica a 645 e 663 nm, utilizando como

<sup>1</sup> Ps – Peso seco total; t1 e t2 – momento 0 e 21 do tratamento com Cd, respectivamente; A – área foliar; P<sub>sf</sub> – Peso seco da folha



branco acetona a 80%. As concentrações das clorofila a (cla), clorofila b (clb) e clorofilas totais (cla+b) foram determinadas de acordo com:

$$\text{Cla (mg.gpf}^{-1}\text{)} = \frac{(12.70 A_{663} - 2.69 \times A_{645}) \times \text{Vol. Amostra}}{\text{peso fresco das folhas}}$$

$$\text{Clb (mg.gpf}^{-1}\text{)} = \frac{(22.90 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}) \times \text{Vol. Amostra}}{\text{peso fresco das folhas}}$$

$$\text{Cl a+b (mg.gpf}^{-1}\text{)} = \text{Cla} + \text{Clb}$$

Para cada amostra, e para fins estatísticos, utilizaram-se 6 réplicas ( $n=6$ ).

### 3.2 Eficiência fotossintética

A eficiência fotossintética foi avaliada através da fluorescência das clorofilas em folhas de *Helianthus annuus* L. sujeitas ao stress com Cd. As medições foram efectuadas aos 0, 8, 15 e 21 dias de tratamento, em grupos de 6 plantas com folhas maduras ( $n=6$ ).

A fluorescência foi medida com o auxílio de um "Plant Efficiency Analyser" – PEA (Hansatech Instruments Ltd.). As folhas foram previamente colocadas na obscuridade durante 30 minutos, sendo de seguida iluminadas por um feixe de luz saturante. O aparelho determinou o nível de fluorescência basal não variável ( $F_0$ ), a fluorescência máxima ( $F_m$ ), a fluorescência variável ( $F_v = F_m - F_0$ ) bem como a razão  $F_v/F_m$ .

### 3.3 Determinação do conteúdo em proteínas solúveis em calli e plantas de *Helianthus annuus* L.

Para proceder à extracção das proteínas solúveis, homogeneizou-se 1 g de material vegetal em 10 mL de tampão de extracção de proteínas (contendo 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM de ácido etileno-diamino tetracético (EDTA); 10 mM 2-mercaptoetanol; 0,1 mM fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF). Centrifugou-se o



homogeneizado a 12000 *g* durante 10 minutos, recolhendo-se posteriormente o sobrenadante.

Para a quantificação de proteínas utilizou-se o método de Bradford (1976) usando para o efeito um Micro Protein Kit (catalog n.º 610-A da Sigma Diagnostics). A concentração de proteínas solúveis foi calculada de acordo com as instruções do fabricante (Sigma Diagnostics, 1998).

Para cada amostra, e para fins estatísticos, utilizaram-se 6 réplicas ( $n=6$ ).

### 3.4 Determinação do Nível de Peroxidação Lipídica (MDA)

O nível de peroxidação lipídica em *Helianthus annuus* L. foi determinado através da medição do conteúdo em malondialdeído (MDA). O MDA é medido por reacção com ácido tiobarbitúrico (TBA) segundo o método de Dhindsa *et al.* (1981)

Para cada amostra pesou-se cerca de 0,5 g de tecido vegetal fresco o qual foi homogeneizado em 5 mL de TCA 0,1% (m/v). Centrifugou-se o homogeneizado a 10000 *g* a 4° C durante 5 minutos. Recolheu-se o sobrenadante que foi separado em alíquotas de 1 mL e aos quais se adicionou 4 mL de TCA a 20% (m/v) contendo TBA a 0,5% (m/v). Seguidamente os tubos foram colocados em banho-maria a 95°C durante 30 minutos. Após este período de tempo os tubos foram imediatamente arrefecidos em gelo. Centrifugou-se novamente a mistura a 10000 *g* durante 10 minutos. Recolheu-se o sobrenadante e leu-se a absorvância específica das amostras a 532 nm contra a absorvância não específica a 600 nm num espectrofotómetro Beckman DV 68.

A concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção molar  $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Dhindsa *et al.*, 1981)

O procedimento descrito foi idêntico para os tecidos caloso e foliar de *Helianthus annuus* L. Para cada amostra, e para fins estatísticos, utilizaram-se 3 réplicas ( $n=3$ ).

### 3.5 Osmolalidade dos tecidos

Para a determinação da osmolalidade dos tecidos o material vegetal foi colocado em tubos de "eppendorf" fechados com tampa perfurada. Estes foram submetidos a dois ciclos de congelação a -30° C, durante 2 a 4 horas e descongelação rápida a 35° C, durante 15 minutos. Este procedimento permite assegurar a ruptura das membranas celulares. Posteriormente o suco celular obtido foi centrifugado a 13000 *g*





durante 10 minutos. A osmolalidade ( $\text{mOs.Kg}^{-1}$ ) dos tecidos foi determinada no osmómetro Knauer – Osmometer Automatic, utilizando o sobrenadante obtido em cada “eppendorf”.

Para o estudo de osmolalidade utilizaram-se folhas e *calli* de *Helianthus annuus* L. por cada tratamento com Cd (0, 5, 50 e 500  $\mu\text{M}$ ), aos 0, 8 e 21 dias de sujeição ao stress. Para cada amostra, e para fins estatísticos, utilizaram-se 6 réplicas ( $n=6$ ).

## 4 Análise de elementos inorgânicos

### 4.1 Análise de macro e micronutrientes

Na preparação de material para a análise de elementos inorgânicos utilizaram-se plantas e *calli* colhidos ao fim dos 0, 8, 15 e 21 dias de exposição ao stress com cádmio. As raízes das plantas foram lavadas em solução de sulfato de cálcio a 0,5 mM durante cerca de 5 minutos e secadas em papel absorvente. Os passos seguintes, no que diz respeito à determinação dos pesos fresco e seco, são idênticos aos descritos anteriormente.

Na preparação das amostras para análise de K, P, Ca, Mg, Mn, Fe, B, Cu e Zn seguiu-se o protocolo descrito por Evers e Bucking (1976). O material seco (de peso conhecido) foi colocado em cadinhos de porcelana e incinerados na mufla a 530 ° C durante 24 horas. As cinzas obtidas por este processo foram então dissolvidas em HCl, procedendo-se da seguinte forma: sobre uma placa de aquecimento colocaram-se os cadinhos contendo as cinzas, às quais se adicionou uma gota de água desionizada e 1,5 mL de HCl 1:1 (v/v). Aqueceu-se a mistura até à ebulição e repetiu-se o passo anterior. De seguida, adicionou-se 5 mL de HCl a 5% (m/v) deixando aquecer ligeiramente. Por fim, filtrou-se o preparado em papel Whatman n.º 1, sob vácuo, lavando-se o cadinho e o filtro em 22,5 mL de HCl a 10% (m/v). Transferiu-se o filtrado para um balão volumétrico e perfez-se o volume até 50 mL com água desionizada.

A quantificação dos macro e micronutrientes realizou-se por ICPS (Inductively Coupled Plasma Spectroscopy) em Jobin Ivon modelo JY70 Plus, com nebulizador Meinhard C001, utilizando para o efeito curvas padrão entre 0 e 100 ppm para o sódio, potássio, cálcio e magnésio e entre 0 e 20 ppm para os restantes elementos. A análise decorreu a 1000 W, com um fluxo de Argon de 12  $\text{dm}^3.\text{min}^{-1}$  e um caudal de amostra de 1  $\text{cm}^3.\text{min}^{-1}$ .

O limite de detecção (LD expresso em  $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) nestas condições e para os elementos referidos são os que constam da tabela II.2.

Tabela II.2 - Limite de detecção e comprimento de onda utilizado para cada análise dos elementos, por ICP (Eugénio Soares, comunicação pessoal, 1998)

Elemento inorgânico	Comprimento de onda (nm)	Limite de Detecção (LD)
<b>K</b>	766.5	0.2
<b>P</b>	213.6	0.05
<b>Ca</b>	396.2	0.01
<b>Na</b>	588.9	0.02
<b>Mg</b>	279.5	0.01
<b>Mn</b>	257.6	0.01
<b>Fe</b>	238.2	0.01
<b>B</b>	249.7	0.01
<b>Cu</b>	324.7	0.01
<b>Mo</b>	202.0	0.01
<b>Zn</b>	213.8	0.01

É de referir que todo o material envolvido na incineração e dissolução das cinzas para análise dos elementos inorgânicos bem como do cádmio foi lavado em HCl comercial a 10% e passado por água desionizada.

A análise realizou-se em tecido caloso, raiz e porção aérea da planta de *Helianthus annuus* L. sujeitas ao stresse com Cd a 0, 5, 50 e 500  $\mu\text{M}$  ao fim dos 0, 8, 15 e 21 dias de tratamento.

Para cada amostra (por tratamento com cádmio ao longo do tempo de exposição ao stresse) utilizou-se um  $n = 4$ .

#### 4.2 Análise de cádmio

A análise de cádmio seguiu o mesmo procedimento descrito para os elementos inorgânicos, tendo-se utilizado 4 réplicas de cada amostra. Estas foram sujeitas aos tratamentos com Cd a 0, 5, 50 e 500  $\mu\text{M}$  ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias de tratamento.



## 5 Actividade enzimática e metabolismo da prolina.

### 5.1 Determinação do teor de prolina em *calli* e plantas de girassol

A extracção e quantificação da prolina foi realizada nos *calli*, raiz e porção aérea das plantas de *Helianthus annuus* L. aos 0, 8 e 21 dias de exposição ao Cd nas concentrações de 0, 5, e 500  $\mu\text{M}$ .

Pesou-se cerca de 0,5 g de material vegetal o qual foi homogeneizado em 10 mL de ácido sulfossalicílico a 3% (m/v). A mistura obtida foi centrifugada a 12000 *g* durante 10 minutos. No final recolheu-se o sobrenadante para proceder à quantificação.

Prepararam-se as soluções de padrão de L-prolina de 0 a 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em ácido sulfossalicílico. Adicionou-se a cada 2 mL de amostra e padrão 2 mL de ninidrina ácida a 2,5% (2,5 g de ninidrina em 60 mL de ácido acético glacial e 40 mL de ácido fosfórico 6 M) e 2 mL de ácido acético glacial. A mistura foi incubada durante 1 hora a 100°C e rapidamente arrefecida em gelo. Adicionou-se tolueno agitando vigorosamente durante cerca de 20 segundos. Depois de atingida a temperatura ambiente aspirou-se o cromóforo, fracção corada contendo o tolueno, da fase aquosa.

A concentração de L-prolina foi determinada com base na leitura da absorvância do cromóforo a 520 nm. A partir das leituras dos padrões construiu-se a curva de calibração em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e determinou-se a concentração de L-prolina em  $\mu\text{g.gpf}^{-1}$  do seguinte modo:

$$\text{L-prolina} = (\mu\text{g.mL}^{-1}) \frac{\text{L-prolina } (\mu\text{g.mL}^{-1}) \times \text{Vol.extracto}}{\text{Peso fresco}}$$

Para fins estatísticos foram utilizadas 3 réplicas ( $n=3$ ) para cada amostra. O procedimento utilizado foi idêntico tanto para as amostras de *calli* como para as de raiz ou porção aérea de *Helianthus annuus* L..

### 5.2 Actividade da aminotransferase da ornitina (OAT; EC 2.6.11.3)

Pesou-se 2 g de tecido fresco e homogeneizou-se em solução tampão de extracção contendo: 0,1M de tampão fosfato de potássio pH 7,4, 1 mM de piridoxal – 5-fosfato, 1 mM de EDTA, 10 mM de mercaptoetanol e 1% de polivinilpirrolidona. Filtrou-se por 4 camadas de gaze e centrifugou-se a 10000 *g* durante 20 minutos a



4°C. Incubou-se o extracto em 0,1 M de tampão fosfato (pH 8,0), 50 mM ornitina, 20 mM  $\gamma$ -cetoglutarato, 1 mM de piridoxal fosfato, durante 10 minutos a 37°C. Adicionou-se TCA 10%. Adicionou-se em seguida orto-aminobenzaldeído (0,5%) e incubou-se a 37°C durante 10 minutos. Centrifugou-se a 10000 *g* durante 15 minutos. Leu-se a absorvância a 440 nm. Determinou-se a actividade da enzima em nmol de OAT por mg de proteína por minuto ( $\text{nmolmg}^{-1}\text{min}^{-1}$ ), (para o doseamento de proteínas, ver em 3.3 Doseamento de proteínas em *calli* e plantas de *H. Annuus*, página 35).

Para fins estatísticos foram utilizadas 3 réplicas ( $n=3$ ) para cada amostra. O procedimento utilizado foi idêntico tanto para as amostras de *calli* como para as de raiz ou porção aérea de *Helianthus annuus*.

### **5.3 Actividade da reductase da pirrolina-5-carboxilato (P5Cr; EC1.5.1.2)**

Pesou-se 2 g de tecido fresco e homogeneizou-se em solução tampão de extracção contendo: 0,1 M de tampão fosfato de potássio (pH 7,4), 1 mM de piridoxal -5-fosfato, 1 mM de EDTA, 10 mM de mercaptoetanol, 1% de polivinilpirrolidona. Filtrou-se por 4 camadas de gaze e centrifugou-se a 10000 *g* durante 20 minutos a 4°C. Incubou-se o extracto em 1 mM de pirrolina-5-carboxilase, 120  $\mu$ M de NADH, 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,4) e extracto de enzima. Leu-se a absorvância a 340 nm. Determinou-se a actividade da enzima em nmol P5CR por mg de proteína por minuto. (para o doseamento de proteínas, ver em 3.3 Doseamento de proteínas em *calli* e plantas de *H. Annuus*, página 35).

Para fins estatísticos foram utilizadas 3 réplicas ( $n=3$ ) para cada amostra. O procedimento utilizado foi idêntico tanto para as amostras de *calli* como para as de raiz ou porção aérea de *Helianthus annuus*.

### **5.4 Actividade da oxidase da prolina (OP; EC 1.4.3.1)**

Pesou-se 2 g de tecido fresco e homogeneizou-se em almofariz em 2 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 e contendo ainda Triton X-100 e mercaptoetanol (10 mM). Após filtração por 4 camadas de gaze, centrifugou-se a 10 000 *g*, 10 min., a 4°C. Usou-se o sobrenadante para dosear a actividade da oxidase da prolina em nmol de enzima por mg de proteína por minuto. Incubou-se a 37°C durante 10 minutos a mistura contendo: 10 mM de citocromo c, 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 8,0; 0,5% (v/v) Triton X-100 e extracto de enzima. Adicionou-se ao fim desse período, TCA (10%) e orto-aminobenzaldeído 0,5%. Incubou-se a 37°C durante 10



minutos. Centrifugou-se a 10000 *g* durante 10 minutos. Leu-se a absorvância a 440 nm. Doseou-se as proteínas do extracto pelo método de Bradford (1972). (para o doseamento de proteínas, ver em 3.3 Doseamento de proteínas em *calli* e plantas de *H. Annuus* , página 35).

Para fins estatísticos foram utilizadas 3 réplicas (n=3) para cada amostra. O procedimento utilizado foi idêntico tanto para as amostras de *calli* como para as de raiz ou porção aérea de *Helianthus annuus*.

## 6. Tratamento estatístico

Para todos os ensaios efectuados, o grau de significância dos resultados foi determinado com base no teste da ANOVA uni ou bifactorial para valores de significância de  $p < 0,05$  ou  $p < 0,001$  (consoantes as situações). O tratamento estatístico foi realizado pelo programa SigmaStat versão 2.03.

## CAPÍTULO III

### Resultados

#### 1 Aspecto externo das plantas e *calli* de *Helianthus annuus*

##### 1.1 Aspecto das plantas

Como é possível verificar nas figuras III.1 e III.2, as plantas revelaram um nítido atraso de crescimento quando sujeitas a concentrações crescentes de cádmio, sendo este efeito mais evidente para a concentração de 500  $\mu$ M. A redução de crescimento traduziu-se num decréscimo do diâmetro do caule e do hipocótilo nas plantas a crescer em 5  $\mu$ M relativamente ao das plantas a crescer em condições controlo, enquanto as plantas a crescer em 50 e 500  $\mu$ M sofreram aparentemente um decréscimo do comprimento e diâmetro dos caules e hipocótilo.



Figura III.1 – Aspecto das plantas de *Helianthus annuus* em culturas hidropónicas, colhidas após 15 dias de exposição a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M cádmio.

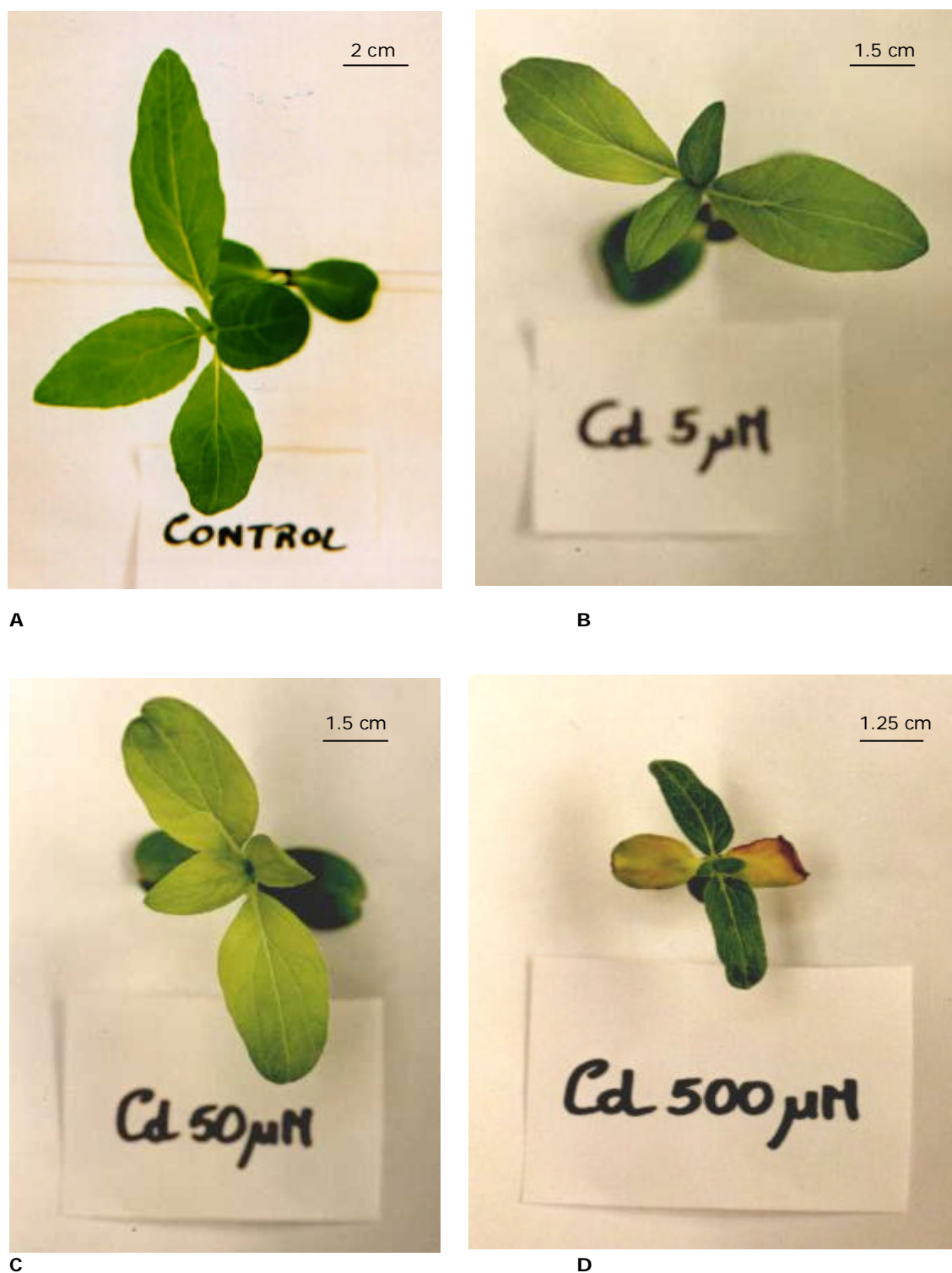


Figura III.2 – Aspecto das folhas de plantas de *Helianthus annuus* L. expostas a concentrações crescentes de cádmio em cultura hidropônica, após 15 dias de tratamento. A - planta controlo; B - planta exposta a 5  $\mu\text{M}$  de cádmio; C - planta exposta a 50  $\mu\text{M}$  de cádmio e D - planta exposta a 500  $\mu\text{M}$  de cádmio.

As raízes apresentaram-se acastanhadas, e as folhas apresentaram, para além de uma redução aparente da sua área, uma tonalidade amarelada nas concentrações 5 a 50 e verde na concentração de 500  $\mu$ M. As plantas expostas a 500  $\mu$ M apresentaram, quer na porção aérea quer na raiz, um aspecto necrosado (figura III.1), que se começava a evidenciar logo na primeira semana de tratamento, agravando-se com o tempo.

### 1.2 Aspecto do tecido caloso

O tecido caloso apresentou uma redução do crescimento (Figura III.3) e algum escurecimento com o aumento da concentração de cádmio no meio. No entanto, os sintomas de fenolização e escurecimento dos *calli* tratados com Cd surgiram apenas nas duas últimas semanas de tratamento.

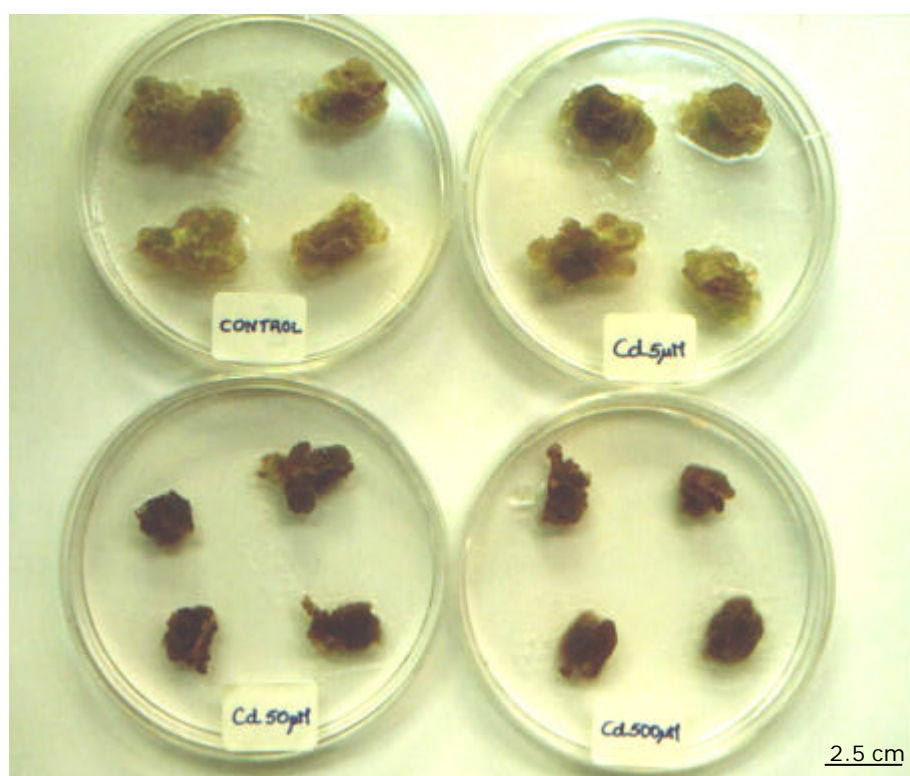


Figura III.3 - Aspecto do tecido caloso de *Helianthus annuus* exposto a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M de cádmio após 15 dias de tratamento.



## 2. Determinação das taxas de crescimento

### 2.1 Comprimento das plantas de *Helianthus annuus*

#### 2.1.1 Comprimento da raiz

Após tratamento estatístico pode verificar-se que, em geral, não houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no crescimento das raízes das plantas expostas às diferentes concentrações de cádmio, ao longo do tempo (figura III.4)

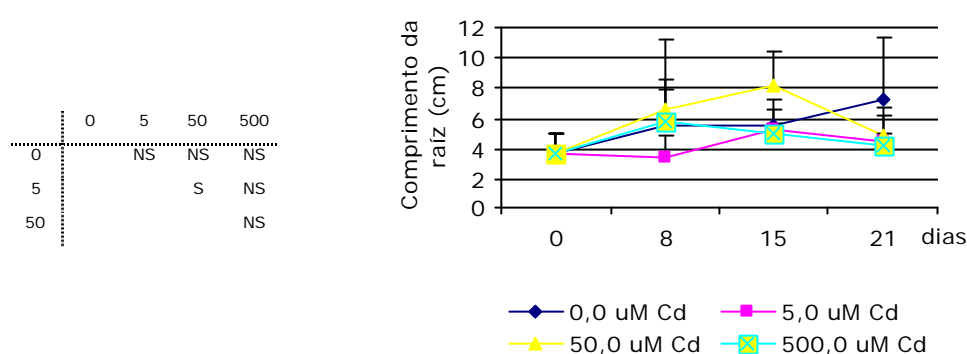


Figura III.4 – Comprimento (cm) da raiz de *Helianthus annuus* L. aos 0, 8, 15 e 21 dias de exposição a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M de cádmio. O tratamento estatístico pela ANOVA *one way* refere-se à significância dos resultados obtidos aos 21 dias de exposição ao metal ( $p < 0,05$ ; GL= 3; F= 2.981); S – significativamente diferente; NS – não significativamente diferente.

#### 2.1.2 Comprimento da porção aérea

Com base nas medições efectuadas ao longo da exposição, foi possível verificar que nas plantas controlo e sujeitas a 5  $\mu$ M, o comprimento da porção aérea aumentou ao longo do tempo não havendo diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) durante todo o tratamento (figura III.5) entre as duas condições referidas. Contudo, as plantas expostas a 500  $\mu$ M revelaram, a partir de 8 dias, uma inibição do crescimento (figura III.5). Desde cedo estas foram as que manifestaram um crescimento mais reduzido comparativamente às restantes plantas.

No final do ensaio o desfasamento de crescimento das plantas sujeitas aos vários tratamentos foi evidente, apresentando as plantas controlo e as expostas a 5  $\mu$ M um maior crescimento, seguindo-se as plantas expostas a 50  $\mu$ M com crescimento ligeiramente menor, e finalmente as plantas expostas a 500  $\mu$ M que sofreram a maior inibição de crescimento (figura III.5).

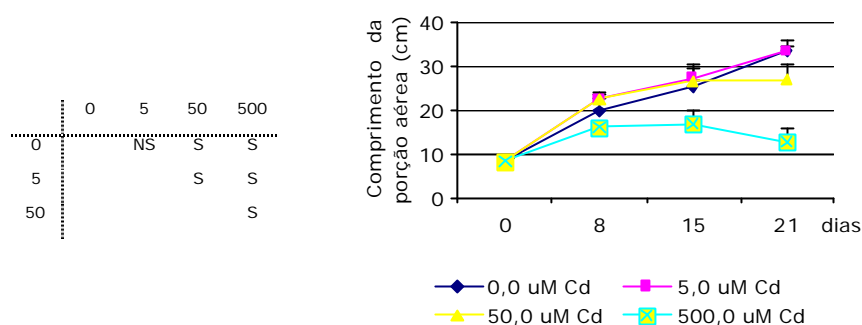


Figura III.5 - Comprimento (cm) da porção aérea das plantas de *Helianthus annuus* L., aos 0, 8, 15 e 21 dias de exposição a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M de cádmio. O tratamento estatístico pela ANOVA *one way* refere-se à significância dos resultados obtidos aos 21 dias de exposição ao metal ( $p < 0.001$ ; GL= 3;  $F = 33.614$ ); S – significativamente diferente; NS – não significativamente diferente.

### 2.1.3 Razão porção aérea/raiz

As razões entre o comprimento da porção aérea da planta e o comprimento da raiz aumentaram em geral ao longo do tempo, tendo as plantas expostas a 5  $\mu$ M uma razão porção aérea/raiz mais elevada. Nas plantas expostas a 500  $\mu$ M a razão porção aérea/raiz sofreu apenas um ligeiro aumento durante os 21 dias de tratamento (figura III.6).

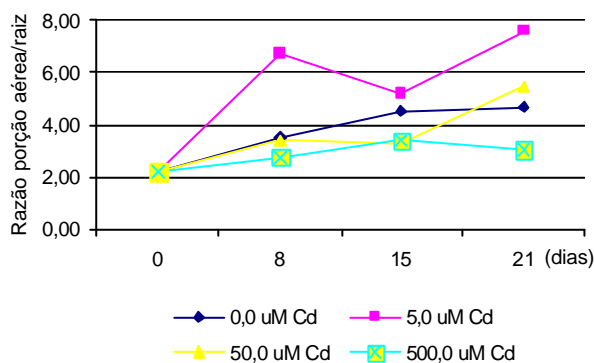


Figura III.6 – Razão entre comprimento da porção aérea e raiz aos 0, 8, 15 e 21 dias de exposição a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M de cádmio.

## 2.2 Variação do peso fresco

Excepto para o tratamento com 500  $\mu$ M cádmio, as plantas e *calli* de girassol apresentaram em geral um aumento do peso fresco ao longo do tempo (figura III.7).

As raízes de plantas controlo e expostas a 5  $\mu$ M apresentaram sempre um aumento de peso fresco durante o ensaio. Em contrapartida, as raízes de plantas expostas a 50 e 500  $\mu$ M de cádmio tiveram um aumento de peso fresco até aos 8 dias, ocorrendo a partir desta altura uma estabilização ou ligeiro decréscimo (figura III.7.A).

As folhas e caules tiveram um comportamento similar ao longo do tempo em função das concentrações de cádmio (figuras. III.7B e C).

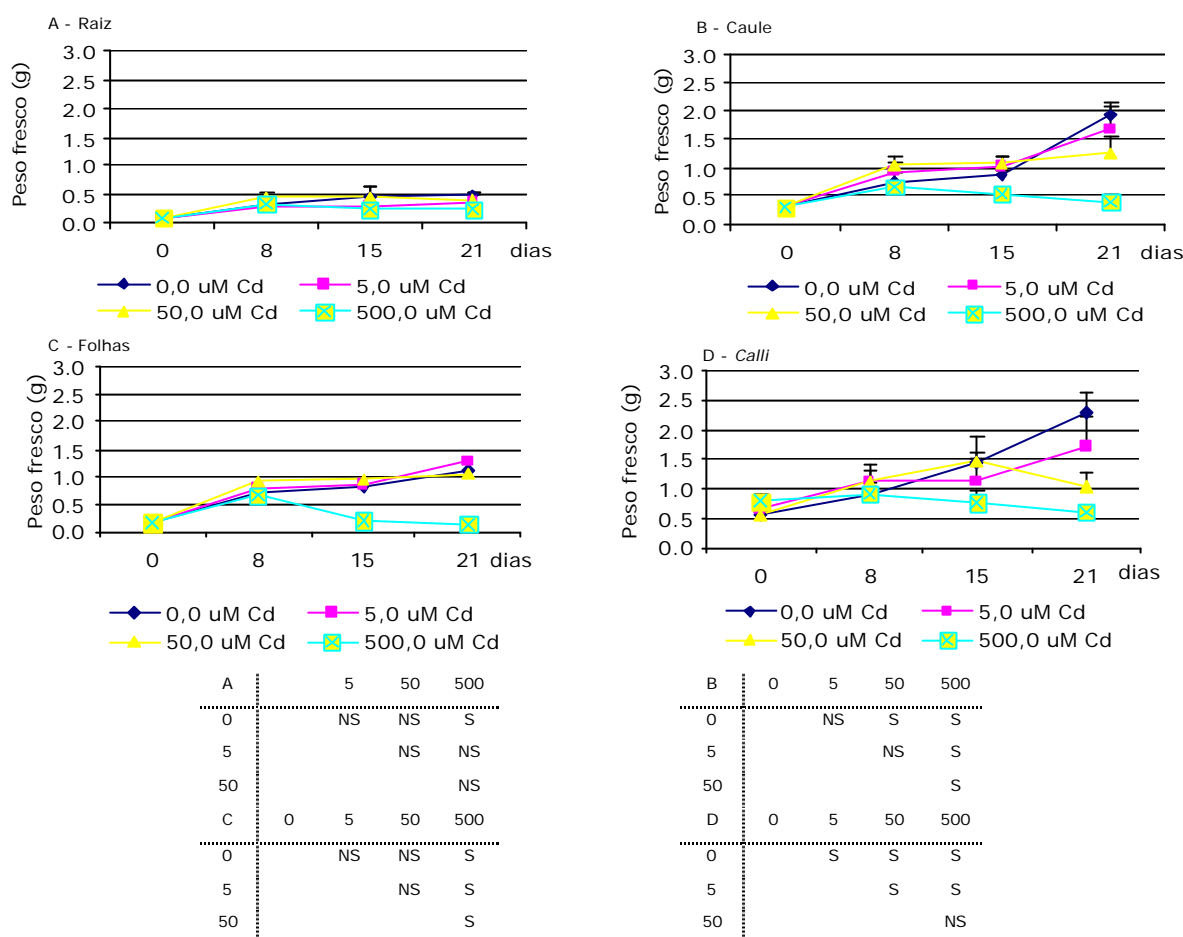


Figura III.7 - Variação do peso fresco de plantas *Helianthus annuus* em cultura hidropónica e *calli in vitro* sujeitos a tratamento com cádmio 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias. A- variação do peso fresco na raiz ( $p < 0.05$ ; GL= 3; F= 4.217); B - variação no peso fresco no caule ( $p < 0.001$ ; GL= 3; F= 33.742); C - variação do peso fresco nas folhas ( $p < 0.001$ ; GL= 3; F= 41.057); D - variação do peso fresco nos calli ( $p < 0.001$ ; GL= 3; H= 21.375). As tabelas referem-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *one way*. S: significativamente diferente; NS: Não significativamente diferente.

Apenas a concentração de 500  $\mu$ M decresceu os pesos frescos de caule e folhas a partir de 15 dias de tratamento. Aos 21 dias verificou-se, contudo, que também a concentração de 50  $\mu$ M diminuiu o peso fresco do caule, relativamente ao controlo e às plantas expostas a 5  $\mu$ M (figura III.7C). Verificou-se um aumento de peso fresco durante todo o tratamento para *calli* controlo e tratados com cádmio 5  $\mu$ M (Fig.

III.7D). Pela análise da figura III.7D, observou-se também que as concentrações mais elevadas de cádmio reduziram o crescimento ao longo do tratamento. Ao fim de 21 dias de exposição a cádmio, todos os grupos apresentaram diferenças significativas nos seus pesos, verificando-se uma redução em função do aumento da concentração deste metal (figura III.7.D).

### 2.3 Variação do peso seco

Os pesos secos da porção aérea e raiz das plantas controlo aumentaram, em geral, ao longo do tempo (figura III.8 A - C).

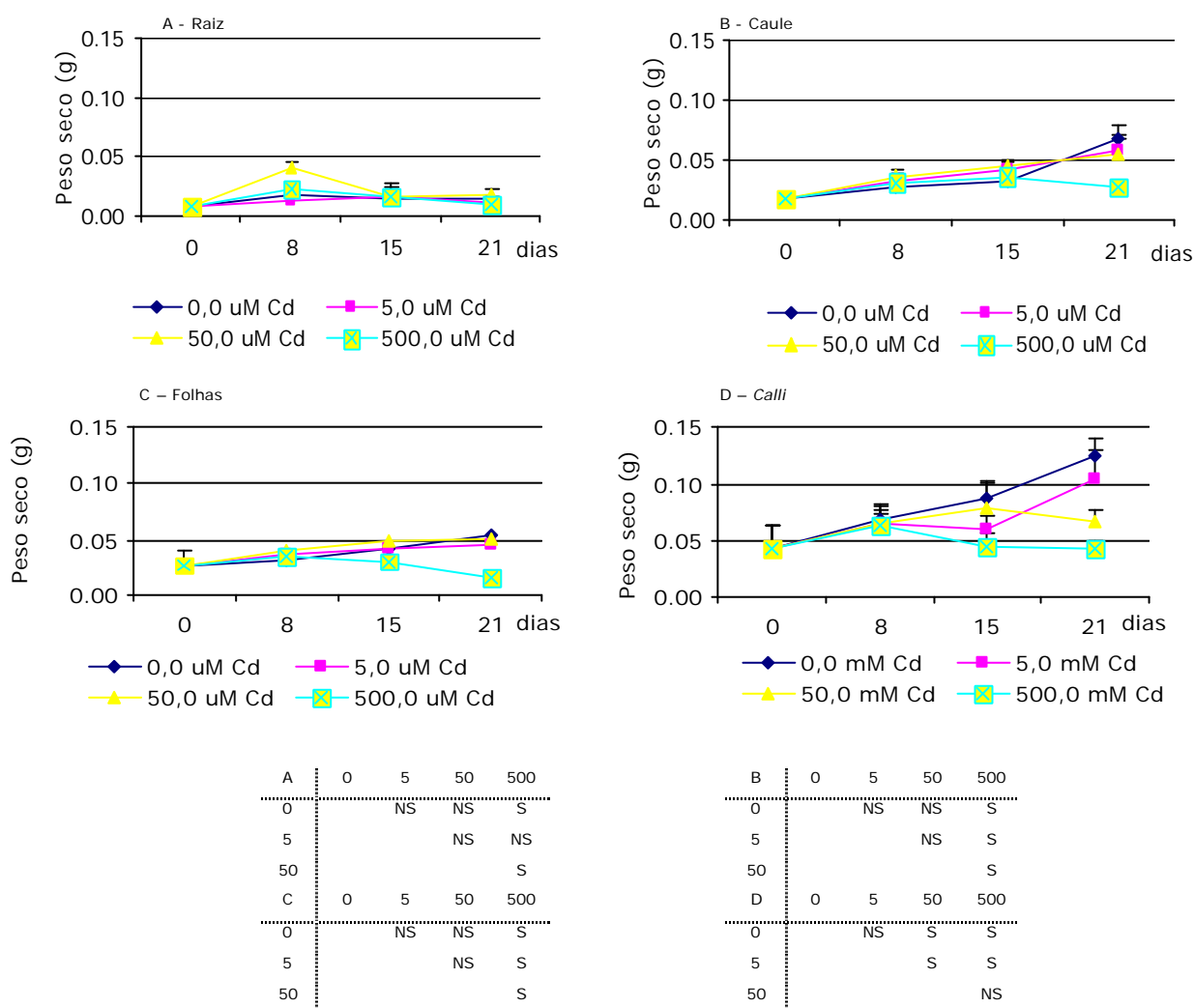


Figura III.8 - Variação do peso seco de plantas de *Helianthus annuus* em cultura hidropônica e *calli in vitro* sujeitos a tratamento com cádmio 0, 5, 50 e 500 µM ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias. A- variação do peso seco na raiz ( $p < 0.05$ ; GL= 3; F= 6.299); B – variação no peso seco no caule ( $p < 0.001$ ; GL= 3; F= 15.037); C – variação do peso seco nas folhas ( $p < 0.001$ ; GL= 3; F= 31.004); D – variação do peso seco nos *calli* ( $p < 0.001$ ; GL= 3; F= 27.242); As tabelas referem-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *one way*. S: significativamente diferente; NS: Não significativamente diferente.

Em plantas expostas a 500  $\mu\text{M}$  de cádmio, o peso seco da raiz decresceu com o aumento de concentração deste metal relativamente ao controlo (figura III.8A).

O caule e as folhas apresentaram um comportamento bastante idêntico. Ao fim de 21 dias de tratamento, apenas os caules e folhas tratados com 500  $\mu\text{M}$  de cádmio, sofreram uma redução significativa do peso seco (figura III.8.B e C).

Nos *calli*, observou-se que a concentração de 5  $\mu\text{M}$  não afectou o peso seco relativamente ao controlo. Por sua vez, a concentração de 50  $\mu\text{M}$  decresceu significativamente o peso seco, relativamente ao controlo e à concentração de 5  $\mu\text{M}$ . Mais uma vez, o tratamento com 500  $\mu\text{M}$  foi o que mais afectou o peso seco dos *calli* (figura III.8D).

## 2.4 Conteúdo hídrico

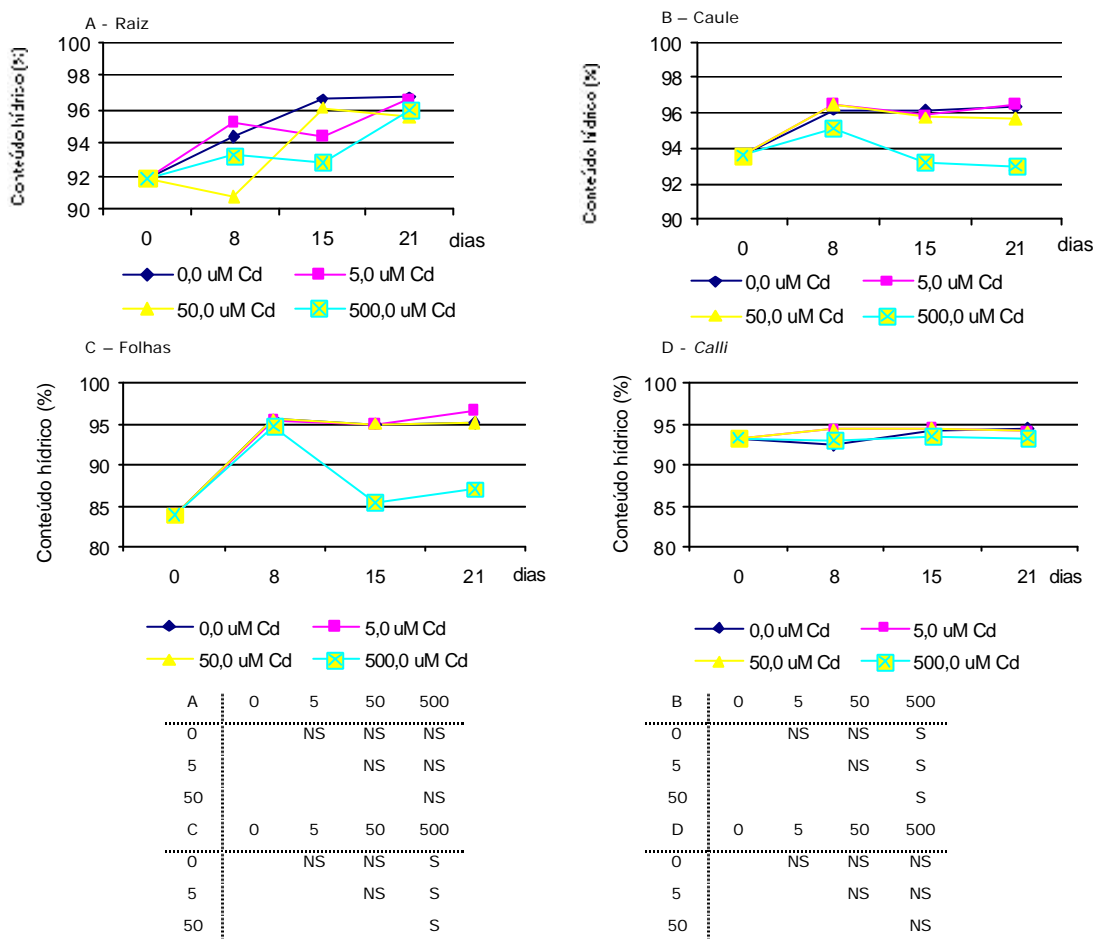


Figura III.9 - Variação do conteúdo hídrico de plantas de *Helianthus annuus* em cultura hidropónica e de *calli in vitro*, sujeitos a tratamento com cádmio 0, 5, 50 e 500  $\mu\text{M}$  ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias. A- variação do conteúdo hídrico na raiz; B - variação do conteúdo hídrico no caule; C - variação do conteúdo hídrico nas folhas; D - variação do conteúdo hídrico nos *calli*. As tabelas referem-se ao tratamento estatístico dos resultados obtidos após 21 dias de exposição ao metal, pela ANOVA *one way*. S: significativamente diferente; NS: Não significativamente diferente.

A figura III.9 mostra que as plantas expostas a cádmio 500  $\mu\text{M}$  sofreram um decréscimo do conteúdo hídrico da porção aérea (caule e folha) da planta, sendo este decréscimo significativo a partir dos 15 dias de tratamento.

Nos *calli* expostos a cádmio não se encontraram oscilações significativas do conteúdo hídrico (figura III.9).

## 2.5 Área Foliar

Da análise da figura III.10 é possível verificar que a área foliar das plantas sujeitas ao tratamento com cádmio 500  $\mu\text{M}$  foi afectada negativamente. As concentrações de 5 e 50  $\mu\text{M}$  de cádmio não afectaram a área foliar relativamente ao controlo.

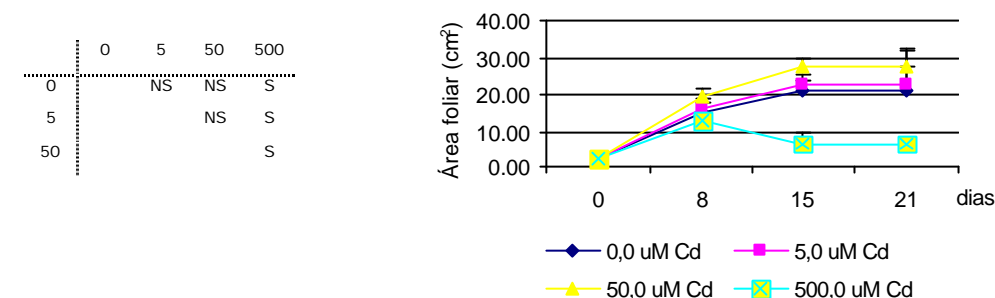


Figura III.10 - Variação da área foliar de plantas de *Helianthus annuus* expostas a 0, 5, 50 e 500  $\mu\text{M}$  de cádmio, ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias. A tabela refere-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *one way* ( $p < 0.001$ ; GL=3; F= 79.921); S – significativamente diferente; NS – não significativamente diferente.

## 2.6 Determinação de RGR, NAR, LAR, SLA e LWR

O RGR foi afectado pela concentração de cádmio no meio, atingindo para 500  $\mu\text{M}$  valores negativos. Estes valores confirmam que concentrações elevadas de cádmio afectam o crescimento das plantas (ver figuras. III. 8 e III.10).

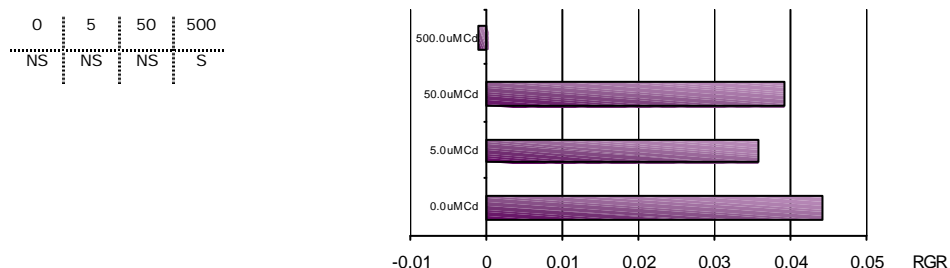


Figura III.11 – Efeito das elevadas concentrações de cádmio na taxa de crescimento relativo (RGR) de plantas de *Helianthus annuus* L. ao fim de 21 dias de exposição ao metal. As tabelas referem-se aos valores de significância para  $p < 0.05$ ; S: significativamente diferente; NS: não significativamente diferente.

A análise da taxa média de NAR e de LAR (figura III.12) e o valor de SLA (figura III.13) revelaram um efeito negativo exercido por elevadas concentrações de cádmio (500  $\mu\text{M}$ ) no meio de cultura. Em contrapartida, o LWR aumentou nas plantas expostas a 500  $\mu\text{M}$  de cádmio ao fim dos 21 dias de tratamento (Fig. III.13).

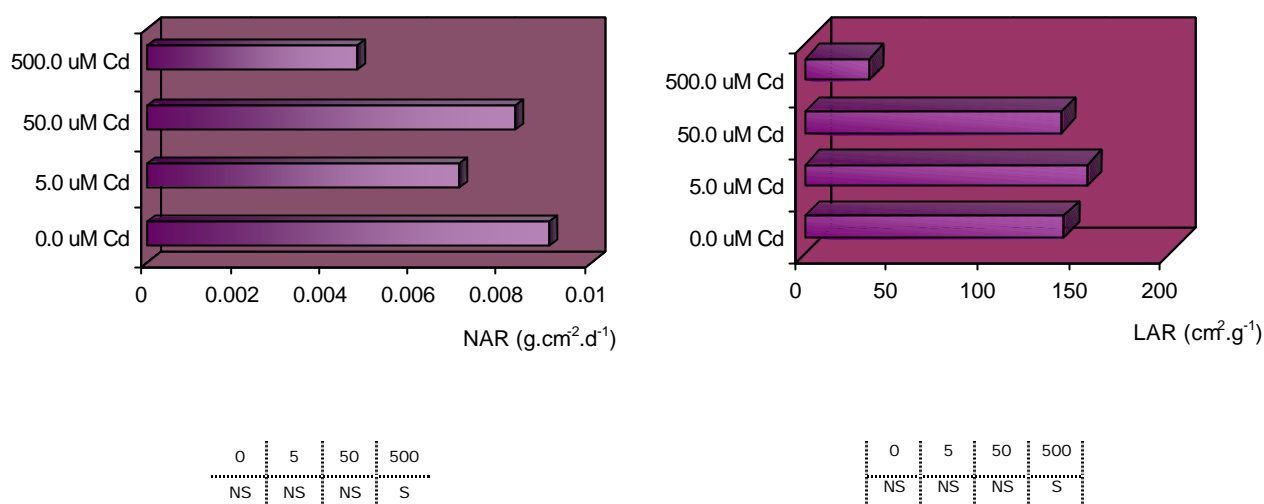


Figura III.12 – Efeito das elevadas concentrações de cádmio na taxa de assimilação líquida (NAR) e na razão da área foliar (LAR) de plantas de *Helianthus annuus* L. ao fim de 21 dias de exposição ao metal. As tabelas referem-se aos valores de significância para  $p < 0.05$ ; S: significativamente diferente; NS: não significativamente diferente.

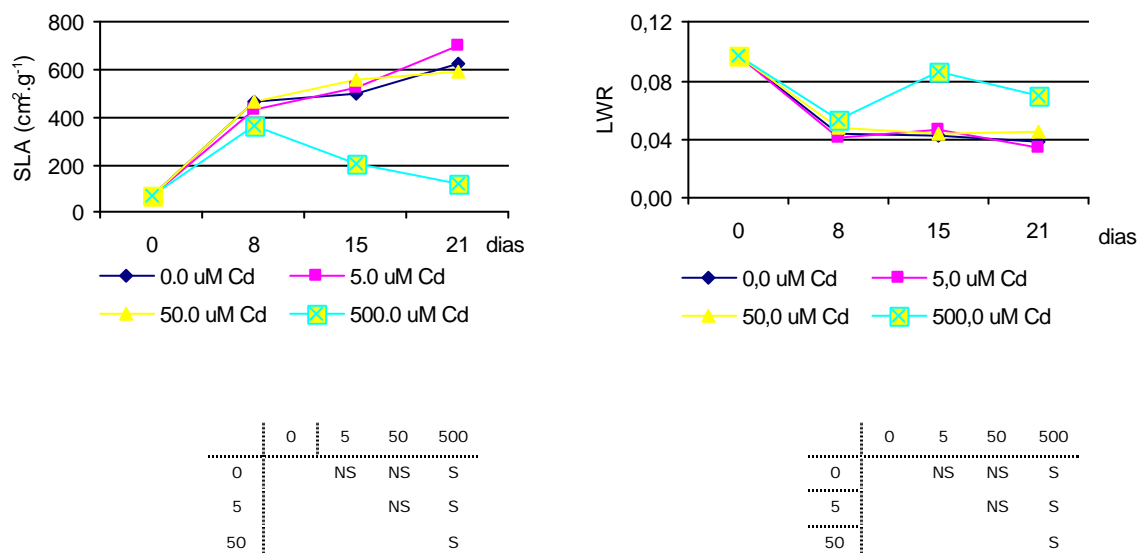


Figura III.13 – Efeito das elevadas concentrações de cádmio na área foliar específica (SLA) e na razão do peso foliar (LWR) de plantas de *Helianthus annuus* L. ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias de exposição ao metal. As tabelas referem-se ao tratamento estatístico pela ANOVA one way ( $p < 0.05$ ; GL=3).

## 2.7 IC<sub>50</sub>

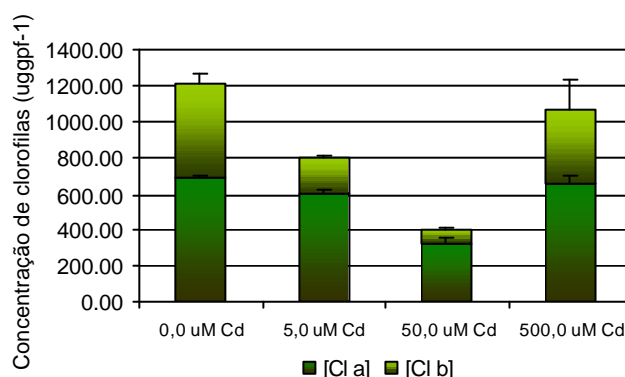
Através da regressão do tipo polinomial, obteve-se a equação  $Y = -1E^{-7}x^2 - 9E^{-5}x + 0.128$  ( $R^2 = 0.943$ ), calculada a partir da variação do peso seco total das plantas aos 21 dias de exposição. A partir desta equação foi determinado o valor de IC<sub>50</sub> de 429,21  $\mu\text{M}$  de Cd. Assim verificou-se que concentrações na ordem dos 429  $\mu\text{M}$  provocam uma redução de 50 % do peso seco total de plantas de girassol. Relativamente aos *calli*, a variação de crescimento do peso seco segue o perfil da equação  $Y = 2E^{-6}x^2 - 0.0011x + 0.1184$  ( $R^2 = 0.973$ ) sendo, para este sistema de cultura, necessário uma concentração de 493,53  $\mu\text{M}$  de Cd para provocar o mesmo efeito.

## 3. Determinação dos parâmetros de senescência

### 3.1 Conteúdo clorofilino

totais	0	5	50	500
0		S	S	NS
5			S	S
50				S
Cla	0	5	50	500
0		S	S	NS
5			S	S
50				S
clb	0	5	50	500
0		S	S	NS
5			NS	NS
50				S

A



	0	5	50	500
0		S	S	NS
5			S	NS
50				S

B

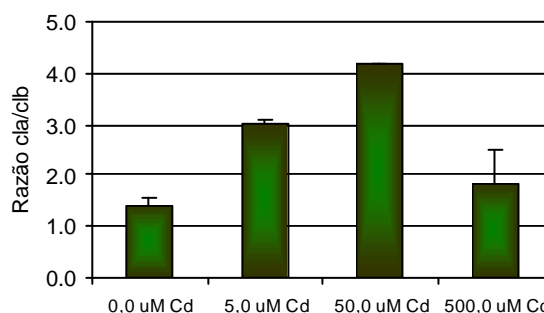


Figura III.14 - Conteúdo clorofilino em folhas de plantas de *Helianthus annuus* expostas a 0, 5, 50 e 500  $\mu\text{M}$  de Cd ao fim de 21 dias de tratamento. A – Conteúdo de Cla, Clb e clorofilas totais ( $p < 0.05$ ; GL=3;  $F=38.016$ ).; B – razão de Cla/Clb ( $p < 0.05$ ; GL=3;  $F=17.675$ ). As tabelas referem-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *one way*; S: significativamente diferente; NS: Não significativamente diferente.



Após 21 dias de exposição, a análise do teor em clorofilas revelou uma redução progressiva e significativa das **cl<sub>a</sub>** e **cl<sub>b</sub>** nas plantas sujeitas a Cd 5 e 50  $\mu$ M comparativamente ao controlo. Foi possível verificar ainda que a redução de **cl<sub>b</sub>** foi bastante mais acentuada que a de **cl<sub>a</sub>**. O mesmo já não se verificou para as plantas sujeitas a Cd 500  $\mu$ M onde o teor em clorofilas se aproximou novamente dos valores do controlo. As clorofilas totais tiveram um comportamento idêntico ao das clorofilas a (figura III.14.A).

Analisando o gráfico relativo à razão **cl<sub>a</sub>/cl<sub>b</sub>** verificou-se que esta aumentou significativamente nas plantas expostas ao Cd 5 e 50  $\mu$ M, enquanto nas plantas expostas a Cd 500  $\mu$ M atingiu valores próximos dos do controlo (figura III.14.B).

### 3.2 Eficiência fotossintética

A exposição a cádmio afectou a eficiência fotossintética das plantas de girassol. Este efeito traduziu-se sobretudo numa redução das fluorescências máxima e variável, dado que a fluorescência basal só foi afectada para a concentração de 5  $\mu$ M (figuras III.15-17). Os valores de Fluorescência máxima (**F<sub>m</sub>**) e Fluorescência variável (**F<sub>v</sub>**) foram mais afectados nas plantas expostas à concentração de 50  $\mu$ M. Curiosamente, as folhas de plantas expostas a 500  $\mu$ M apresentaram uma menor redução da eficiência fotossintética, aproximando-se dos valores das plantas expostas a 5  $\mu$ M (figuras III.16 e III.17).

A figura III.18 mostra a redução da razão **F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>** no controlo ao longo do tempo. As plantas expostas a 50  $\mu$ M de Cd são as únicas que apresentaram um decréscimo de **F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>**, significativamente diferente do controlo e dos outros tratamentos. As plantas expostas a 500  $\mu$ M também apresentaram uma aparente redução da razão **F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>** relativamente ao controlo embora sem significado estatístico.

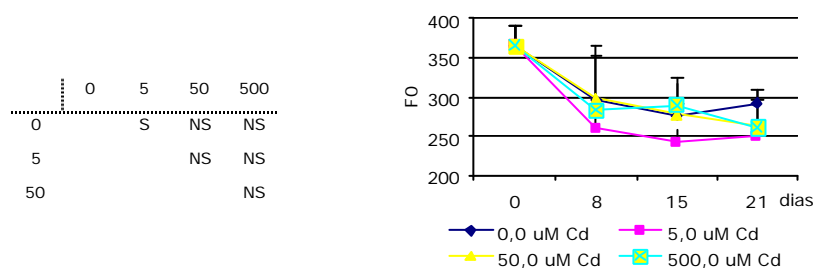


Figura III.15 - Variação da Fluorescência basal em folhas de *Helianthus annuus* expostas a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias. A tabela refere-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *one way* ( $p < 0.05$ ; GL=3;  $F=3.846$ ).

	0	5	50	500
0		S	S	S
5			NS	NS
50				NS

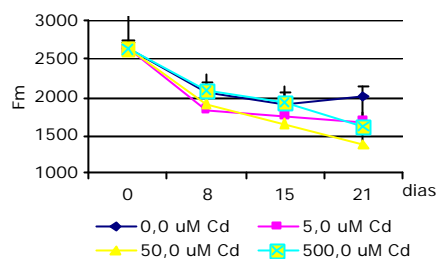


Figura III.16 - Variação da Fluorescência máxima em folhas de *Helianthus annuus* expostas a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias. A tabela refere-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *one way* ( $p < 0.05$ ; GL=3;  $F=7.821$ ).

	0	5	50	500
0		S	S	S
5			S	NS
50				NS

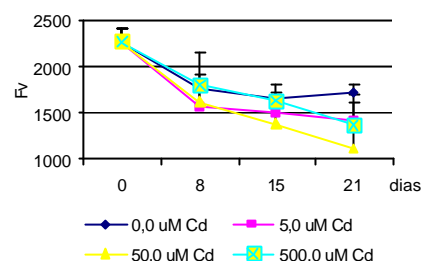


Figura III.17 - Variação da Fluorescência variável em folhas de *Helianthus annuus* expostas a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias. A tabela refere-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *one way* ( $p < 0.05$ ; GL=3;  $F=8.577$ ).

	0	5	50	500
0		NS	S	NS
5			S	NS
50				S

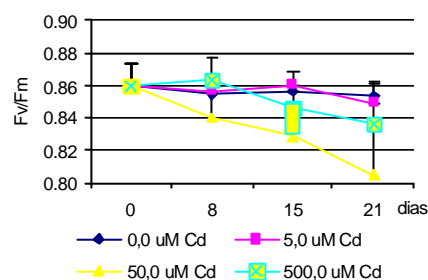


Figura III.18 - Variação da razão Fluorescência variável/Fluorescência máxima em folhas de *Helianthus annuus* expostas a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8, 15 e 21 dias. A tabela refere-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *one way* ( $p < 0.001$ ; GL=3;  $F=11.959$ ).

### 3.3 Conteúdo em proteínas solúveis

Pela análise das figuras III.19 a III.22 verificou-se que, ao fim de 21 dias, o aumento da concentração de cádmio no meio levou a um decréscimo progressivo do conteúdo de proteínas solúveis na raiz (figura III.19) e na porção aérea (caule e folhas) (figuras III.20 e III.21). Este efeito, apesar de poder ser observado ao longo do tempo, foi mais evidente ao fim dos 21 dias de tratamento, em todos os órgão.

Os *calli* apresentaram um comportamento significativamente diferente da raiz e caule das plantas analisados. Aos 8 dias a redução do conteúdo de proteínas solúveis foi

drástica para *calli* expostos a 500  $\mu$ M, e significativamente diferente dos restantes *calli* tratados com 5 e 50  $\mu$ M cujo teor em proteínas foi idêntico ao controlo. Só no final da exposição os *calli* tratados com 50  $\mu$ M Cd apresentaram um decréscimo dos níveis de proteínas para cerca de metade do teor inicial (figura III.22). Por sua vez os *calli* tratados com 5  $\mu$ M não sofreram qualquer alteração do conteúdo em proteínas.

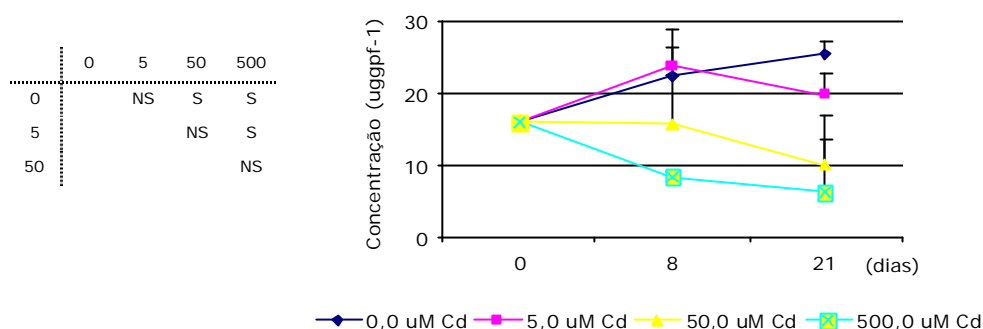


Figura III.19 - Variação da concentração de proteínas solúveis em raízes de *Helianthus annuus* expostas a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8 e 21 dias. A tabela refere-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *two way* ( $p < 0.05$ ; GL= 3; F=56,143); S: significativamente diferente; NS: não significativamente diferente.

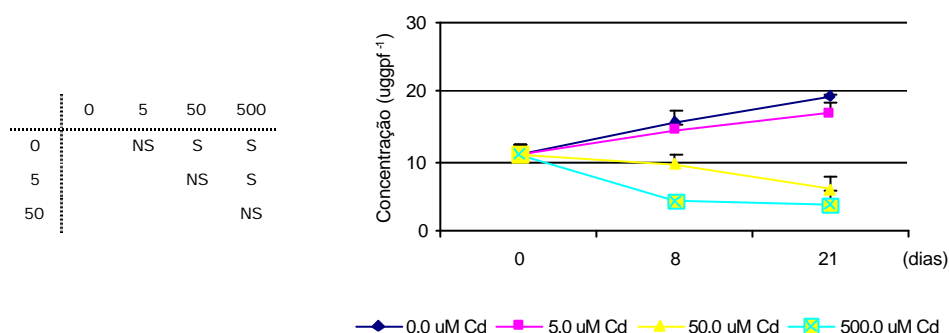


Figura III.20 - Variação da concentração de proteínas solúveis em caules de *Helianthus annuus* expostos a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8 e 21 dias. A tabela refere-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *two way* ( $p < 0.05$ ; GL= 3; F=56,143); S: significativamente diferente; NS: não significativamente diferente.

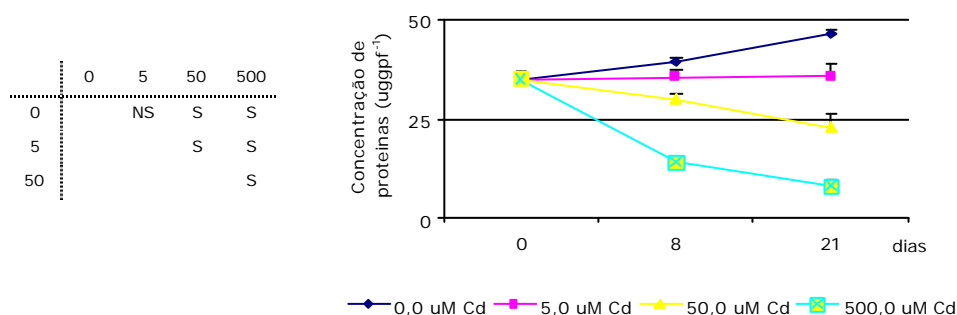


Figura III.21 - Variação da concentração de proteínas solúveis em folhas de *Helianthus annuus* expostas a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8 e 21 dias. A tabela refere-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *two way* ( $p < 0.05$ ; GL= 3; F=56,143); S: significativamente diferente; NS: não significativamente diferente.

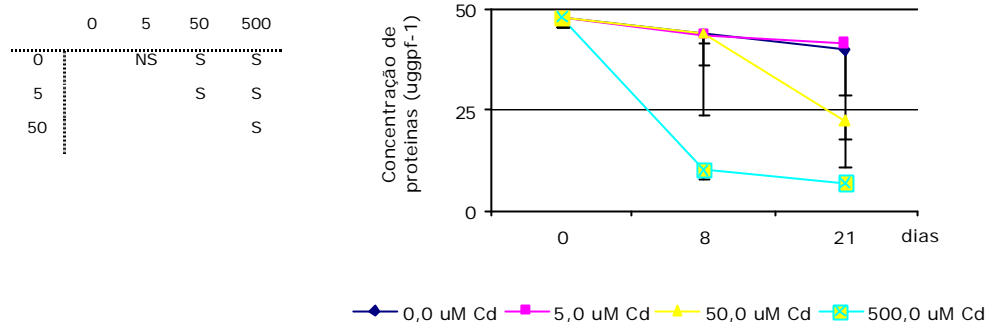


Figura III.22 - Variação da concentração de proteínas solúveis nos *calli* de *Helianthus annuus* expostos a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8, e 21 dias. A tabela refere-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *two way* ( $p < 0.05$ ; GL= 3; F= 56,143); S: significativamente diferente; NS: não significativamente diferente.

### 3.4 Peroxidação lipídica (MDA)

A produção de malondialdeído (MDA) revela o grau de integridade membranar apresentada pelas células de *Helianthus annuus*. É possível verificar que a exposição a Cd promoveu um ligeiro aumento dos níveis de peroxidação lipídica traduzido pelo aumento da produção de MDA nas folhas não tendo afectado significativamente a produção deste composto nos *calli* (figura III.23). Nas células das folhas verificou-se que o acréscimo de MDA só foi significativo para as concentrações de 50 e 500  $\mu$ M de Cd. Nos *calli*, o aumento verificado não foi estatisticamente significativo (figura III.23).

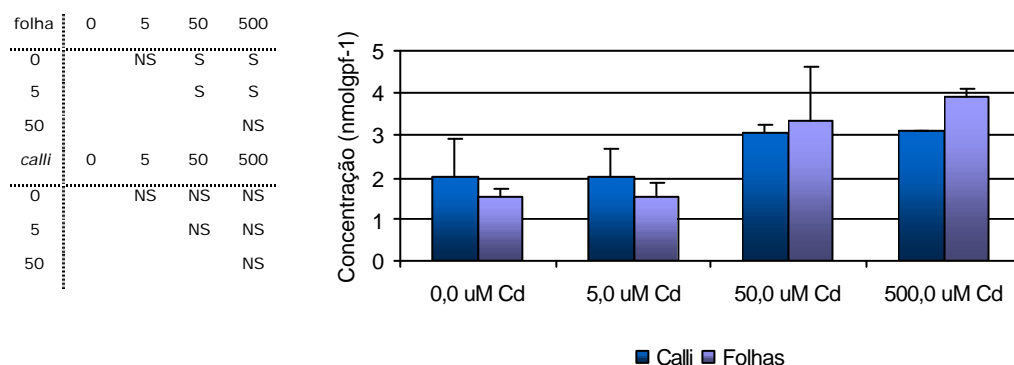


Figura III.23 - Acumulação de MDA nas folha e *calli* de *Helianthus annuus* ao fim de 21 dias de exposição a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M Cd. As tabelas referem-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *two way* ( $p < 0.05$ ; GL=3; F=2.843);

### 3.5 Osmolalidade dos tecidos

As figuras III – 24 a III – 26 revelam que apenas a concentração de 500  $\mu$ M afectou significativamente a osmolalidade dos tecidos da planta (raiz e folhas) e *calli*, onde foi possível observar uma ligeira redução desta. Este efeito foi contudo sempre muito ligeiro.

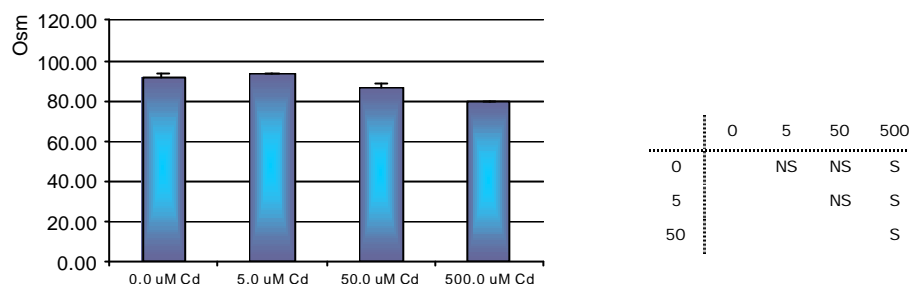


Figura III.24 – Variação da osmolalidade de raízes expostas a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M Cd, ao fim de 21 dias de exposição ao metal. A tabela refere-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *one way* ( $p < 0.05$ ; GL=3; F=19.154)

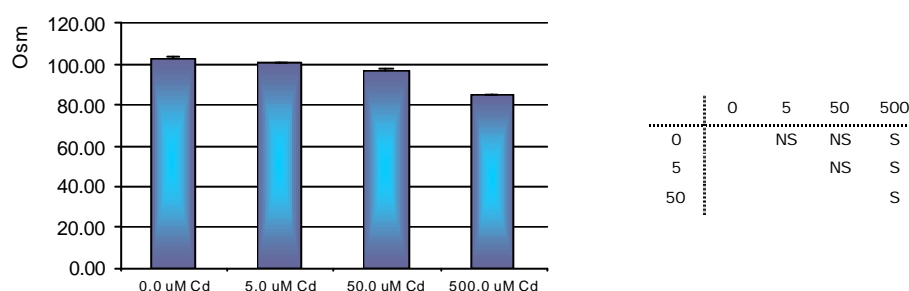


Figura III.25 – Variação da osmolalidade das folhas expostas a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M Cd, ao fim de 21 dias de exposição ao metal. A tabela refere-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *one way* ( $p < 0.05$ ; GL=3; F=19.154).

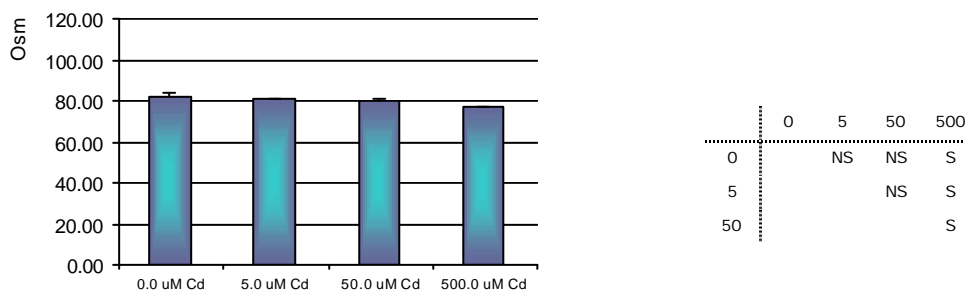


Figura III.26 – Variação da osmolalidade dos *calli* expostos a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M Cd, ao fim de 21 dias de exposição ao metal. A tabela refere-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *one way* ( $p < 0.05$ ; GL=3; F=19.154).

## 4. Análise de elementos inorgânicos na planta e tecido caloso

### 4.1 Análise de macronutrientes (Mg, K, P e Ca)

A análise estatística pela ANOVA *one way* foi efectuada no final da exposição (21 dias).

As variações verificadas ao longo do tempo na acumulação de Mg nas diferentes partes da planta bem como nos *calli* não foram estatisticamente significativas (figura III.27).

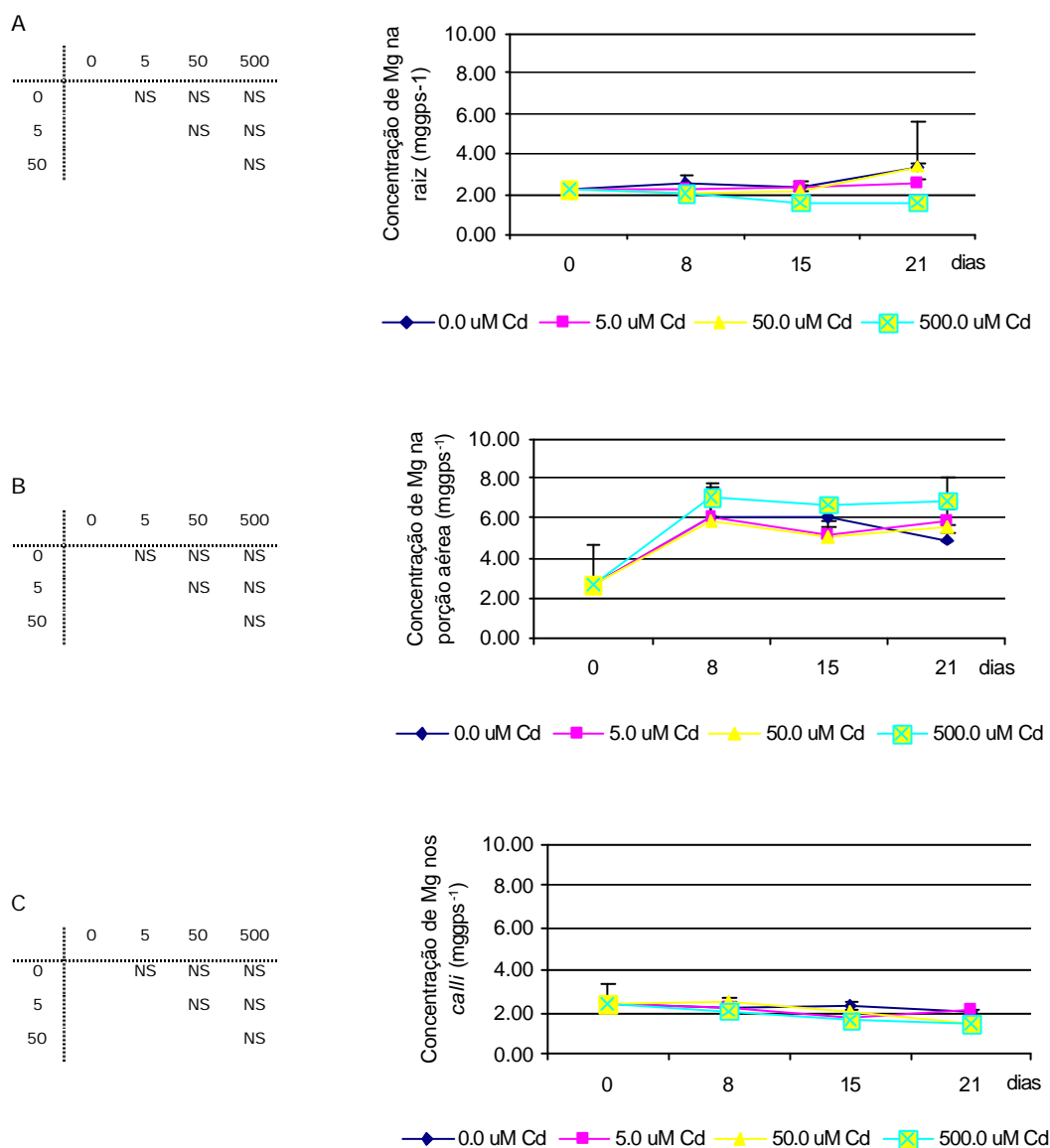


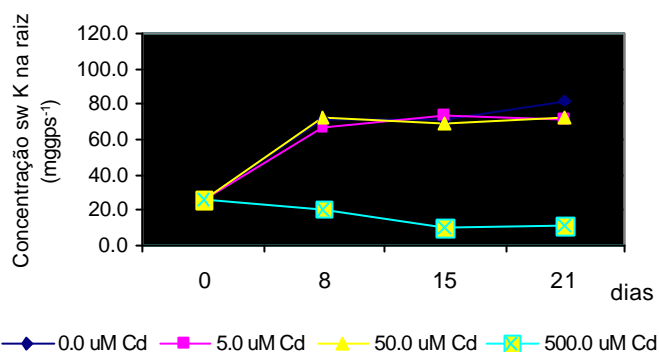
Figura III.27 - Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M na variação da concentração de Mg em *Helianthus annuus* ao longo do tempo. A- concentração de Mg na raiz; B- concentração de Mg na porção aérea; C- concentração de Mg no tecido caloso. As tabelas referem-se ao tratamento estatística pela ANOVA two way ( $p < 0.05$ ; GL=3;  $F = 0.0542$ ). S – significativamente diferente; NS – não significativamente diferente.

O conteúdo de K foi significativamente afectado pela presença de Cd, sobretudo a concentração de 500  $\mu\text{M}$ , verificando-se para esta concentração um decréscimo do seu conteúdo na raiz, logo ao fim de 8 dias de tratamento. Em contrapartida, o decréscimo do conteúdo de K observado na porção aérea só foi evidente a partir dos 15 dias de tratamento. Concentrações de 5 e 50  $\mu\text{M}$  só afectaram os níveis de K na raiz (figura III.28).

Nos *calli* a exposição a cádmio não reduziu a acumulação de K no tecido, dado que os decréscimos observados (figura III.28) não tiveram significado estatístico.

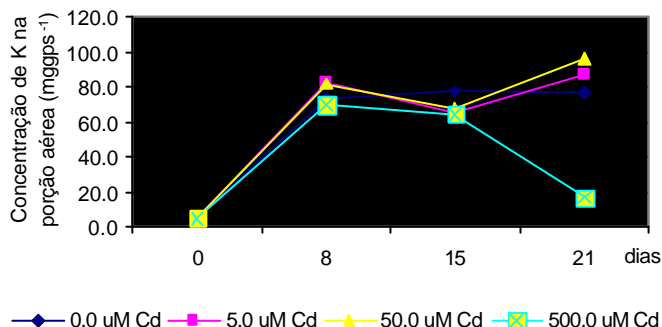
A

	0	5	50	500
0		S	S	S
5			S	S
50				S



B

	0	5	50	500
0		NS	NS	S
5			NS	S
50				S



C

	0	5	50	500
0		NS	NS	NS
5			NS	NS
50				NS

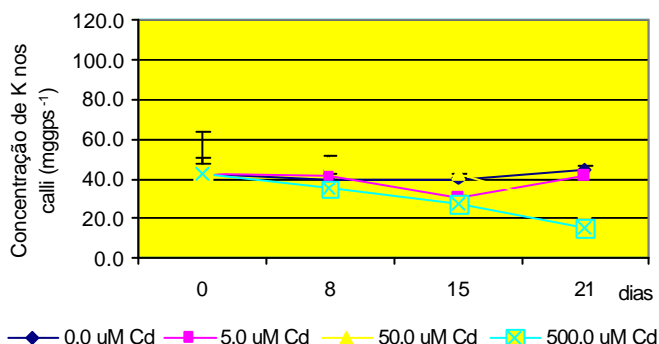


Figura III.28 Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500  $\mu\text{M}$  na variação da concentração de K em *Helianthus annuus* ao longo do tempo. A- concentração de K na raiz; B- concentração de K na porção aérea; C- concentração de K no tecido caloso. As tabelas referem-se ao tratamento estatística pela ANOVA two way ( $p < 0.05$ ; GL=3; F=28.273). S – significativamente diferente; NS – não significativamente diferente.

Não se verificaram alterações estatisticamente significativas da acumulação de P ao longo do tempo, em qualquer dos órgãos das plantas expostas a Cd. Também, no final do tratamento, não houve qualquer efeito do Cd na acumulação de P nos *calli* (figura III.29).

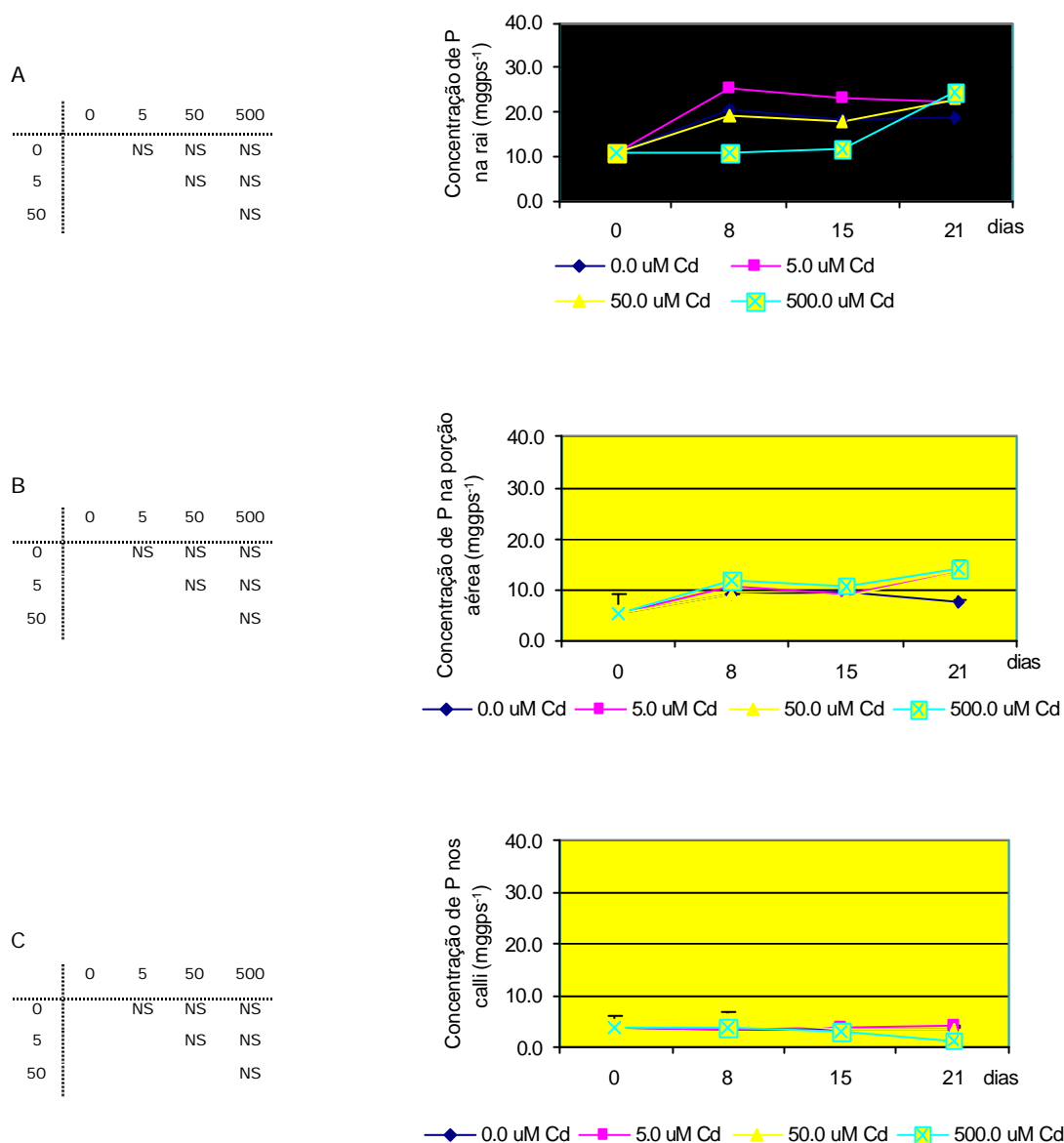


Figura III.29 - Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M na variação da concentração de P em *Helianthus annuus* ao longo do tempo. A- concentração de P na raiz; B- concentração de P na porção aérea; C- concentração de P no tecido caloso. As tabelas referem-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *two way* ( $p < 0.05$ ; GL=3;  $F = 1.104$ ). S – significativamente diferente; NS – não significativamente diferente.



A análise de Ca revelou que 500  $\mu\text{M}$  de Cd pareceu estimular a acumulação deste catião na raiz, visto aos 8 dias houve diferenças significativas pelo tratamento da ANOVA relativamente às raízes controlo. Contudo aos 21 dias essa acumulação baixou para valores próximos do controlo, e assim no final do tratamento a sua concentração nas raízes expostas a 500  $\mu\text{M}$  de Cd era similar à do controlo (figura III.30). Relativamente à porção aérea verificou-se uma redução significativa do conteúdo de Ca sugerindo que houve um efeito na translocação deste catião ao longo da planta.

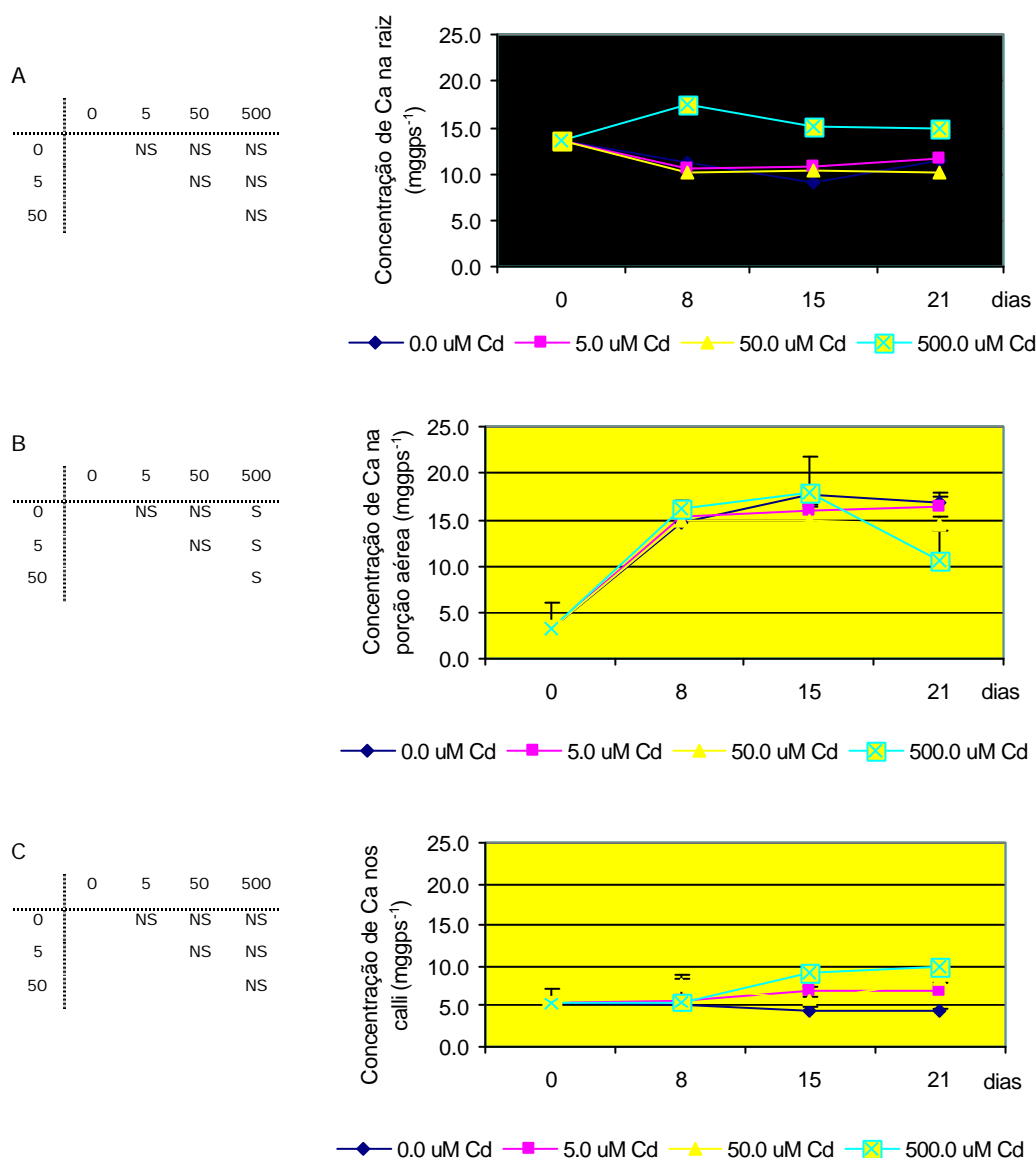


Figura III.30 - Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500  $\mu\text{M}$  na variação da concentração de Ca em *Helianthus annuus* ao longo do tempo. A- concentração de Ca na raiz; B- concentração de Ca na porção aérea; C- concentração de Ca no tecido caloso. As tabelas referem-se ao tratamento estatística pela ANOVA two way ( $p < 0.05$ ; GL=3; F=0.287). S – significativamente diferente; NS – não significativamente diferente.

## 4.2 Análise de micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn e B)

A análise dos micronutrientes revelou que estes são pouco afectados pela presença do cádmio na planta e praticamente não afectados no tecido caloso.

No final do tratamento verificou-se que a exposição a concentrações mais baixas de Cd levou a uma ligeira redução da acumulação de ferro nas raízes, enquanto que a exposição a 500  $\mu$ M não afectava a acumulação deste elemento. Contrariamente, nas porções aéreas e *calli*, a acumulação de Fe não foi afectada pela exposição a qualquer concentração de Cd (figura III.31).

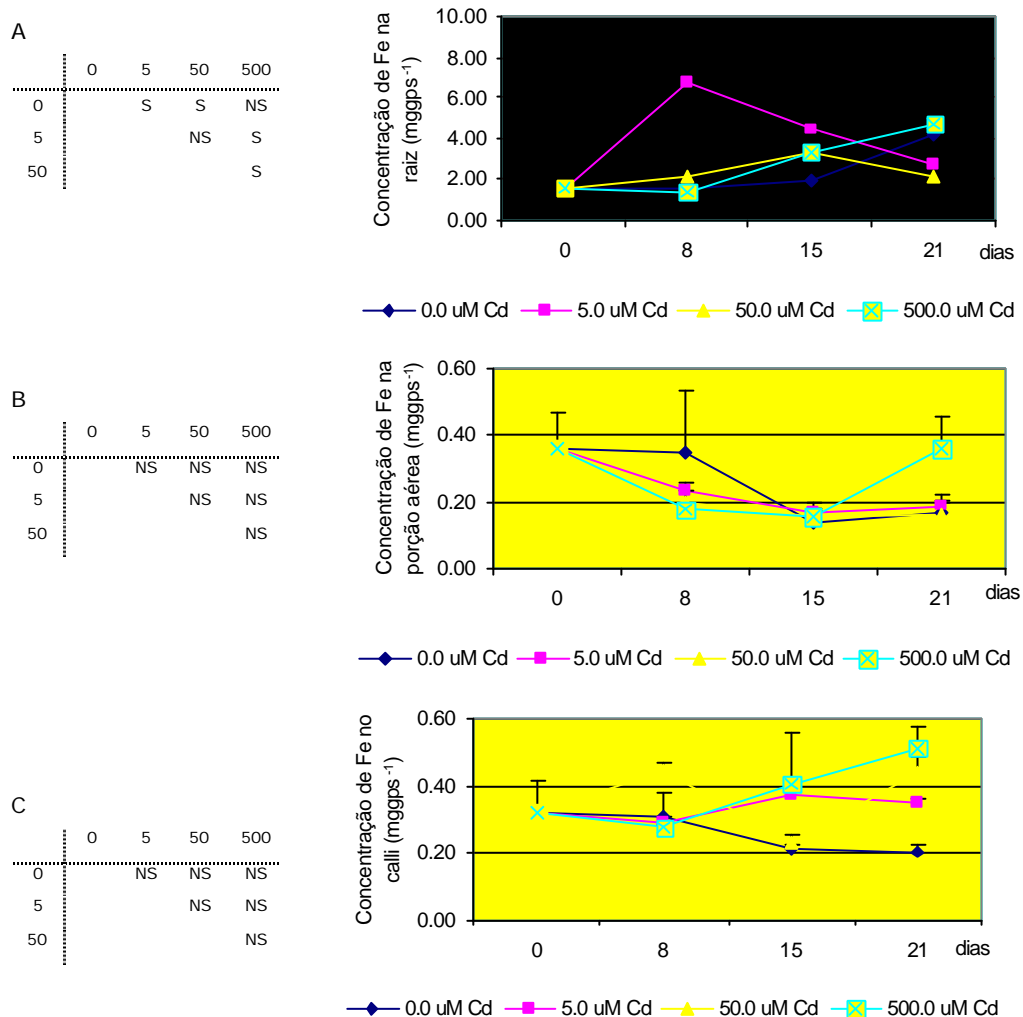


Figura III.31 - Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M na variação da concentração de Fe em *Helianthus annuus* ao longo do tempo. A- concentração de Fe na raiz; B- concentração de Fe na porção aérea; C- concentração de Fe no tecido caloso. As tabelas referem-se ao tratamento estatística pela ANOVA two way ( $p < 0.001$ ; GL=3;  $F=4.752$ ). S – significativamente diferente; NS – não significativamente diferente.

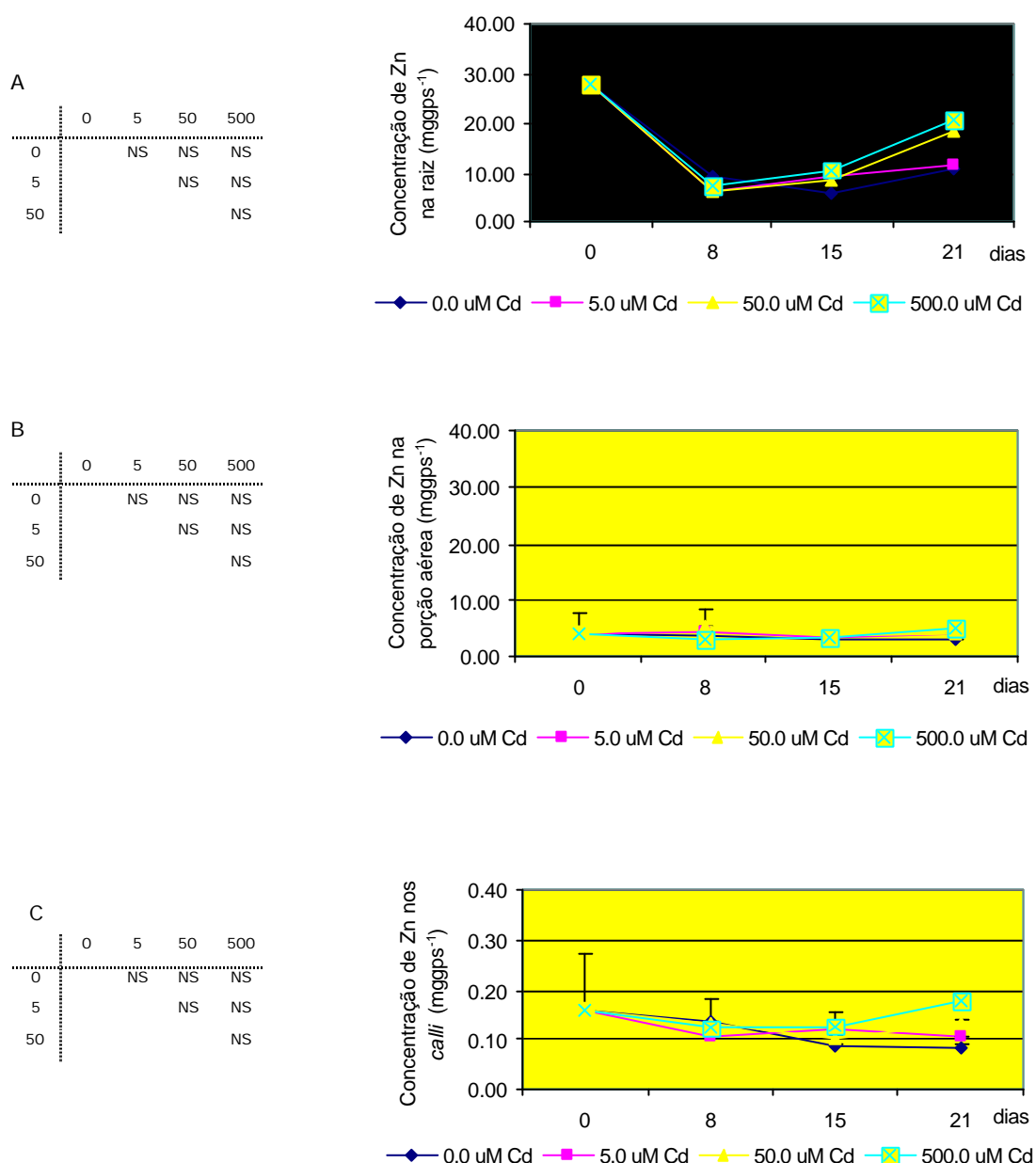


Figura III.32 - Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M na variação da concentração de Zn em *Helianthus annuus* ao longo do tempo. A- concentração de Zn na raiz; B- concentração de Zn na porção aérea; C- concentração de Zn no tecido caloso. As tabelas referem-se ao tratamento estatística pela ANOVA two way ( $p < 0.001$ ; GL=3; F=1.310). S – significativamente diferente; NS – não significativamente diferente.

Não se verificaram variações significativas na acumulação e/ou absorção de Zn (figura III.32) e Cu (figura III.33) nos diferentes órgãos da planta bem como no tecido caloso ao longo do tempo.

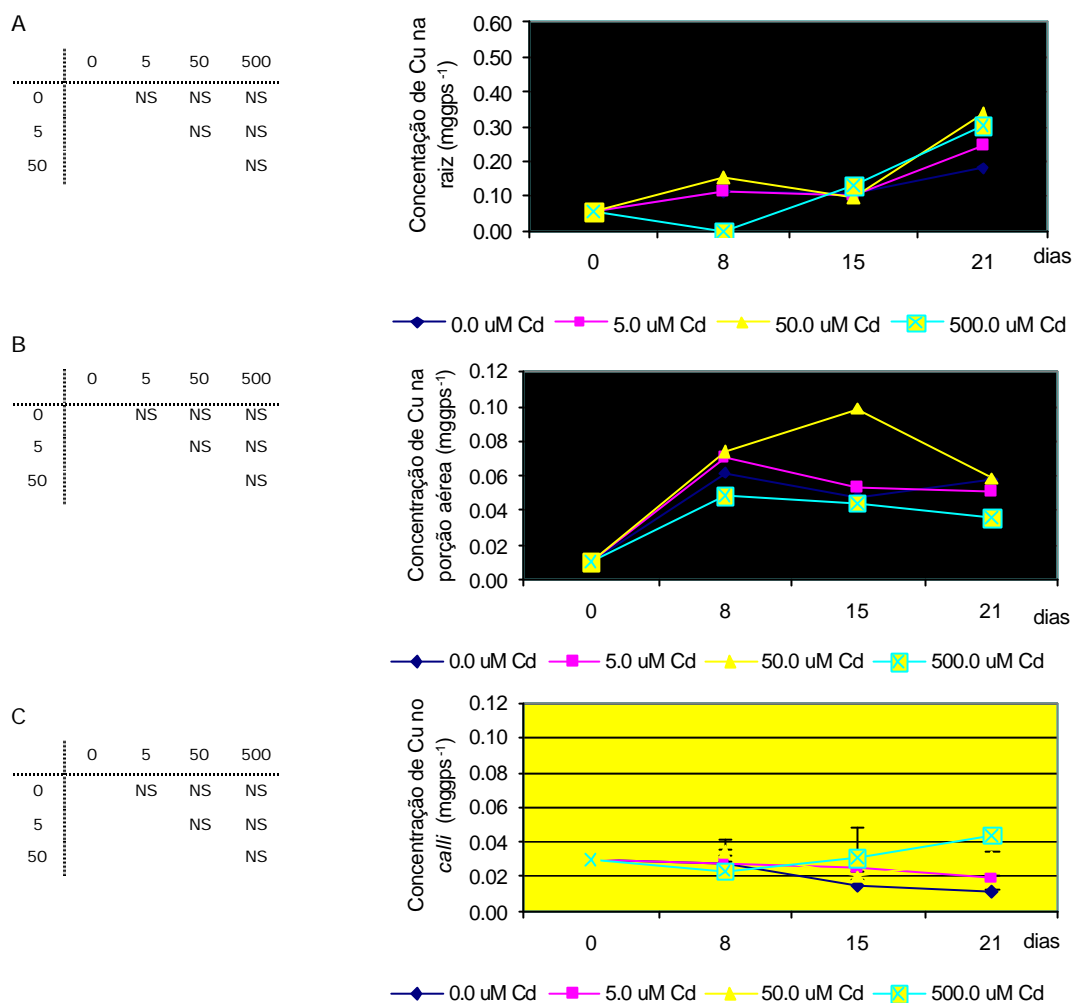


Figura III. 33 - Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M na variação da concentração de Cu em *Helianthus annuus* ao longo do tempo. A- concentração de Cu na raiz; B- concentração de Cu na porção aérea; C- concentração de Cu no tecido caloso. As tabelas referem-se ao tratamento estatística pela ANOVA two way ( $p < 0.001$ ; GL=3; F=0.829). S – significativamente diferente; NS – não significativamente diferente

A concentração de 500  $\mu$ M Cd promoveu, desde os 8 dias de exposição, um aumento da concentração de Mn ao longo do tempo na raiz. Contudo, a exposição a cádmio não afectou a concentração de Mn na porção aérea. No tecido caloso verificou-se que o Cd estimulou embora de uma forma ligeira (e não estatisticamente significativa) a absorção de Mn ao fim de um longo período de exposição (figura III.34).

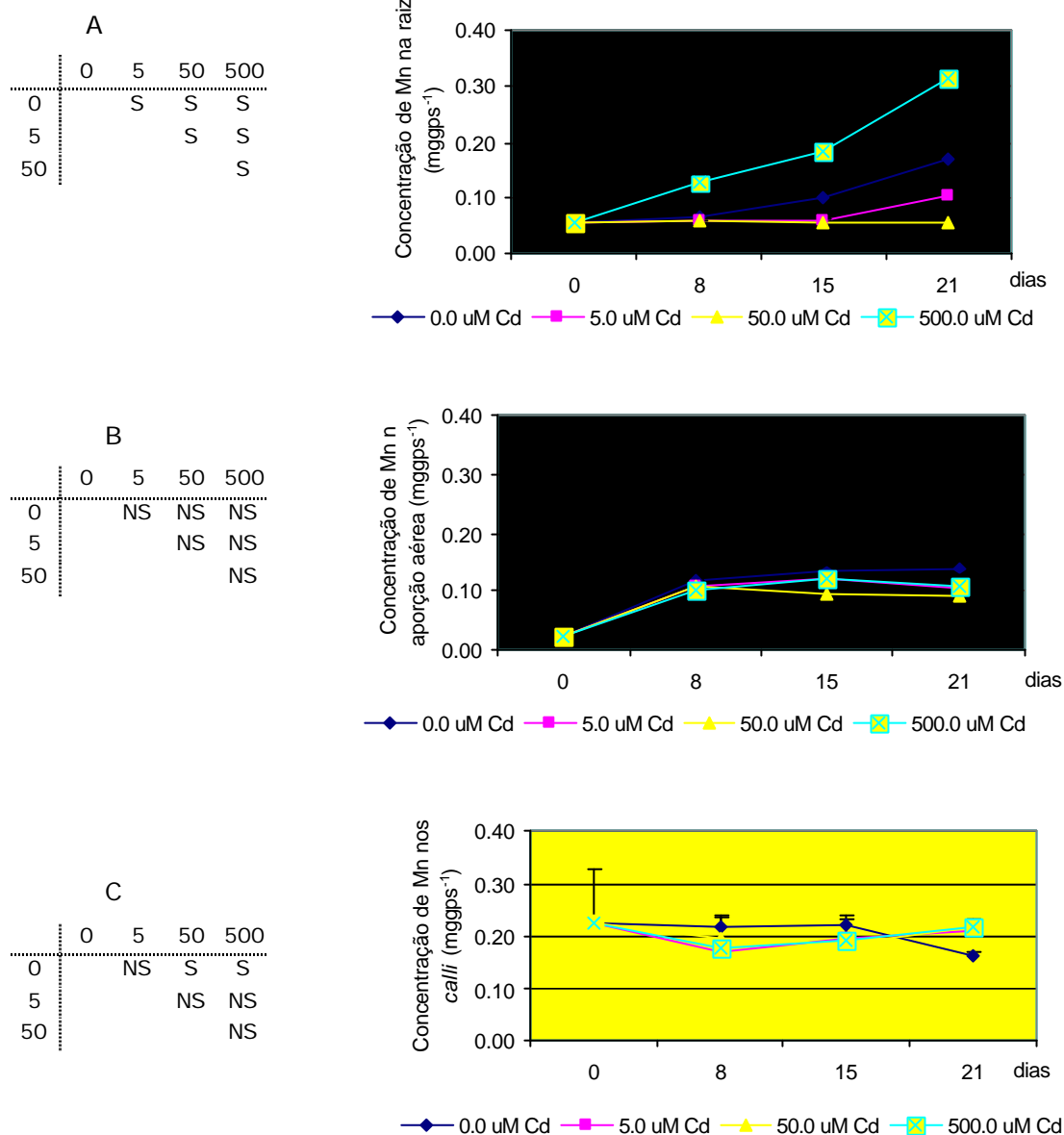


Figura III.34 - Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M na variação da concentração de Mn em *Helianthus annuus* ao longo do tempo. A- concentração de Mn na raiz; B- concentração de Mn na porção aérea; C- concentração de Mn no tecido caloso. As tabelas referem-se ao tratamento estatístico pela ANOVA two way ( $p < 0.001$ ; GL=3;  $F = 34.471$ ). S – significativamente diferente; NS – não significativamente diferente.

O cádmio não afectou a acumulação de B nas plantas e nos *calli*. A análise do gráfico III.35 revela um comportamento aparentemente simétrico da acumulação de B na raiz *versus* porção aérea ao longo do tempo. A quantidade de boro parece baixar nos primeiros 15 dias de tratamento, nas raízes das plantas, enquanto que sobe na porção aérea. Nos *calli* não houve alterações significativas da concentração de boro.

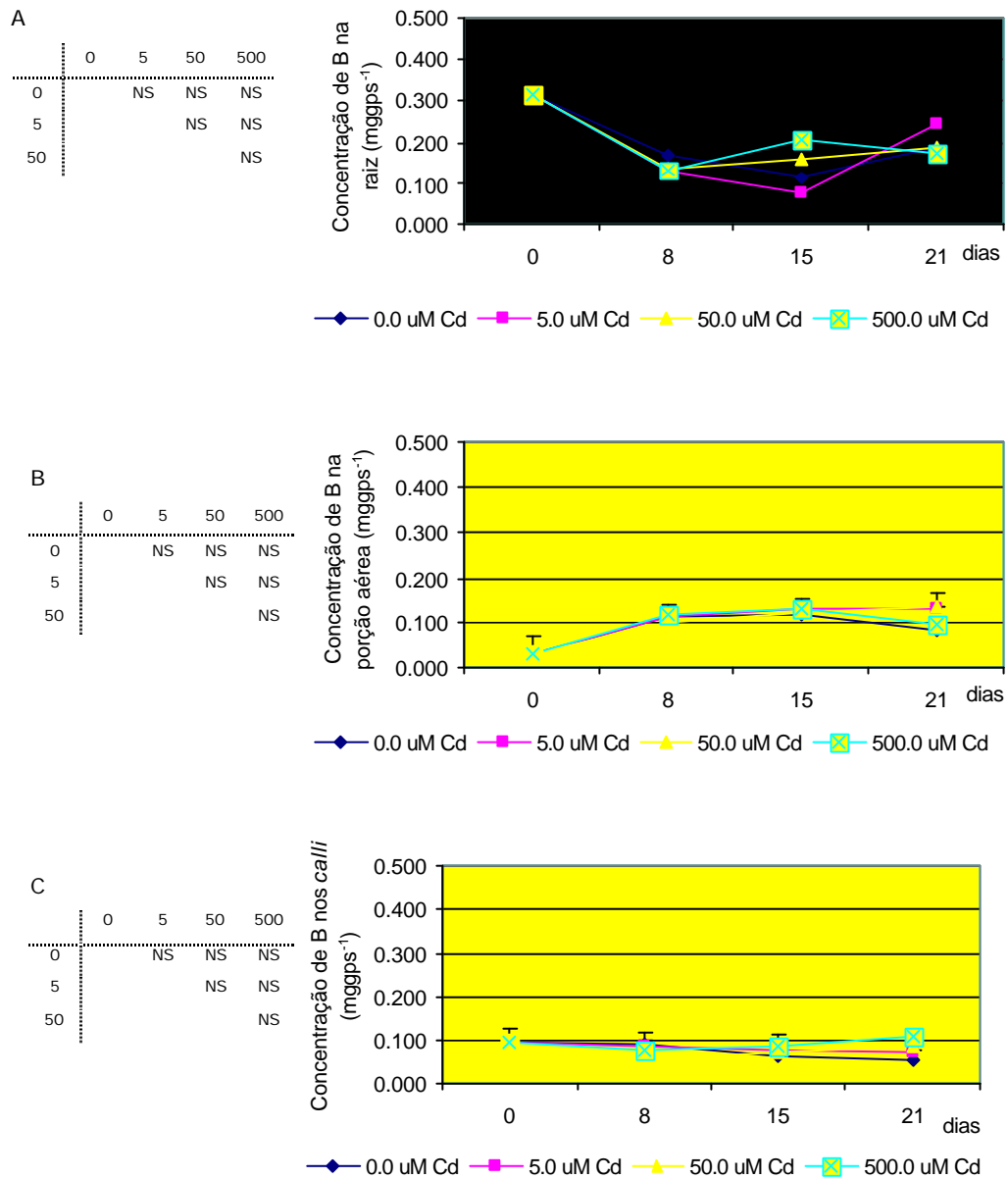


Figura III.35 - Efeito do cádmio a 0, 5, 50 e 500  $\mu$ M na variação da concentração de B em *Helianthus annuus* ao longo do tempo. A - concentração de B na raiz; B- concentração de B na porção aérea; C- concentração de B no tecido caloso. A tabela refere-se ao tratamento estatístico pela ANOVA two way ( $p < 0.05$ ; GL=3;  $F = 3.462$ ); S – significativamente diferente; NS – não significativamente diferente.

### 4.3 Análise de cádmio

O cádmio acumulou-se preferencialmente na raiz da planta, onde a sua concentração atingiu valores de  $86.17 \pm 2.817 \text{ mg.gps}^{-1}$  ao fim de 21 dias de exposição. Para além disso foi evidente que as plantas e *calli* colocados em meios de concentrações elevadas do metal foram os que mais acumularam cádmio (figura III.36).

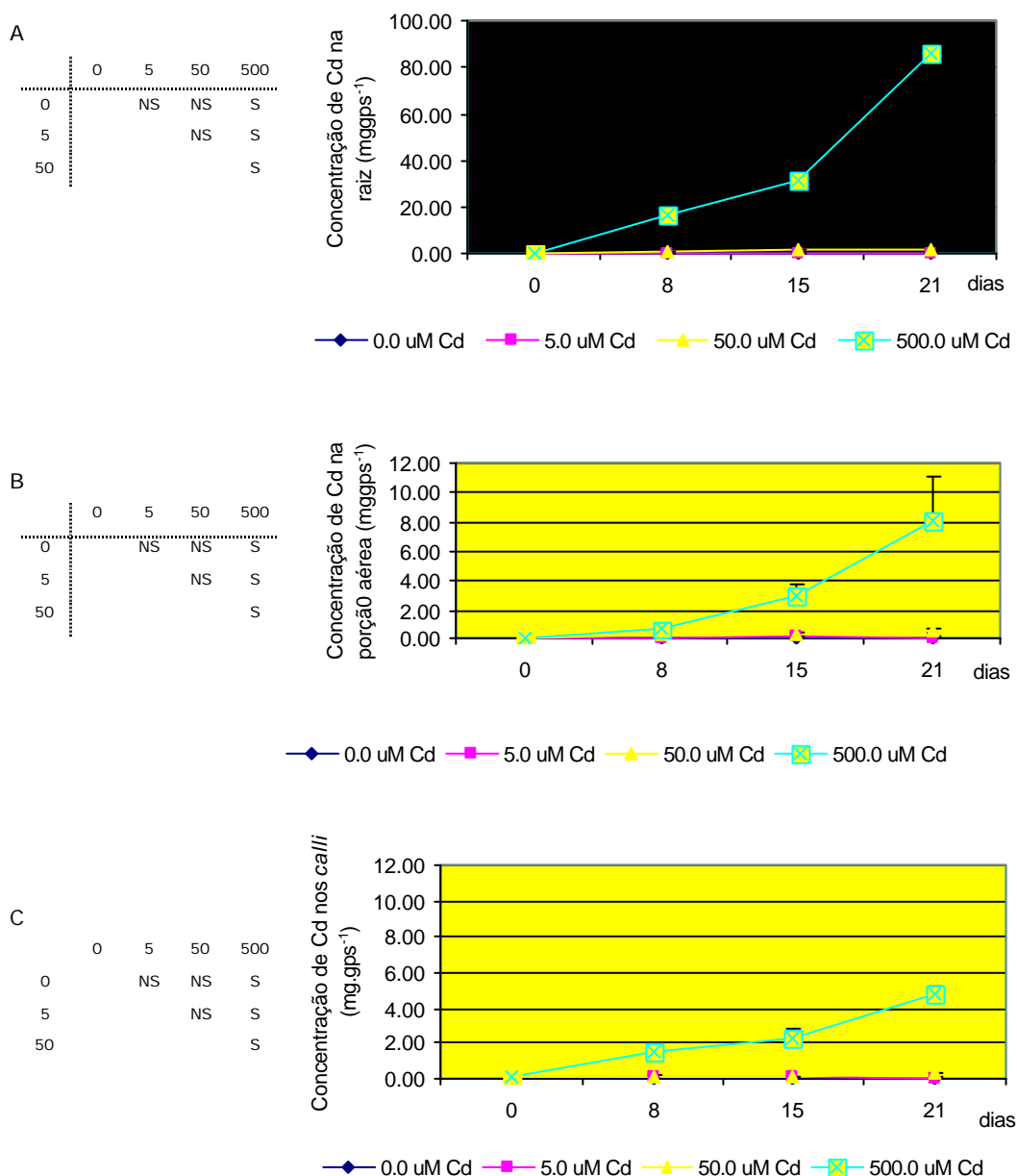


Figura III.36 - Variação da concentração de Cd em *Helianthus annuus* ao longo do tempo. A- concentração de Cd na raiz; B- concentração de Cd na porção aérea; C- concentração de Cd no tecido caloso. A tabela refere-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *two way* ( $p < 0.05$ ;  $GL = 3$ ;  $F = 1304.558$ ); S – significativamente diferente; NS – não significativamente diferente.

Saliente-se que no final do período de exposição (21 dias) a relação da concentração de cádmio presente no meio de cultura com a sua concentração nos diferentes órgãos da planta e nos *calli* traduziu-se numa relação linear, muito mais acentuada na raiz do que na porção aérea e *calli* (figura III. 37).

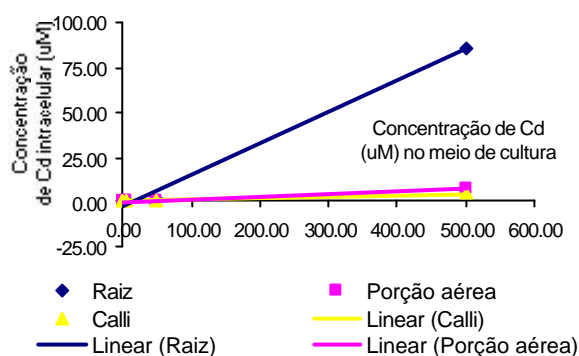


Figura III.37 – Relação linear entre a concentração de cádmio no meio de cultura e no meio intracelular (raiz, porção aérea e *calli*). As rectas representam as linha de tendência (regressão linear) estabelecidas para cada órgão e/ou tecido, com as seguintes equações: Raiz:  $y = 0.1765x - 2.5649$  ( $R^2 = 0.9935$ ); Porção aérea:  $y = 0.0163x - 0.1208$  ( $R^2 = 0.9983$ ); *Calli*:  $y = 0.0098x - 0.0649$  ( $R^2 = 0.9984$ ).

## 5. Actividade enzimática e metabolismo da prolina

### 5.1 Conteúdo em Prolina

A acumulação de prolina variou significativamente com o tempo de exposição e a concentração de Cd a que as plantas e *calli* foram expostos. Contudo esta variação não foi idêntica em ambos os sistemas de cultura.

A raiz de plantas controlo apresentou valores de prolina muito baixos, sem alterações significativas ao longo do tempo. A exposição a cádmio aumentou os níveis de prolina em raízes expostas a 5 e 500 µM sobretudo ao fim de 21 dias. No controlo, o conteúdo médio de prolina situou-se nos  $27.79 \pm 4.99$  µgpf<sup>-1</sup> enquanto que na concentração de 500 µM Cd atingiu os  $94.855 \pm 14.86$  µgpf<sup>-1</sup> e na de 5 µM atingiu valores máximos de mais de 200 µgpf<sup>-1</sup> (figura III.38).

As folhas das plantas controlo e expostas a 5 µM não revelaram alterações do conteúdo em prolina ao longo do tempo (8 e 21 dias). Apenas as folhas tratadas com Cd 500 µM revelam um aumento significativo do teor de prolina. Aqui as concentrações



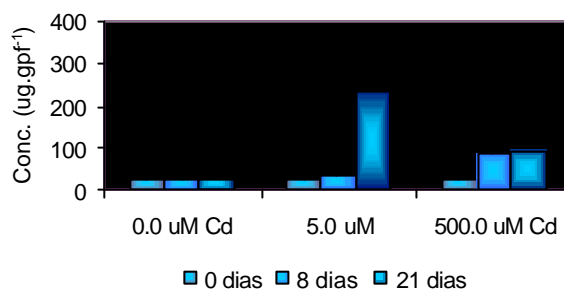
de prolina atingiram valores 90X superiores às da raiz controle aos 8 dias, e 15X aos 21 dias.

O tecido caloso teve um comportamento diferente das plantas da mesma cultivar de girassol. A acumulação de prolina nos *calli* controle foi superior à acumulação deste aminoácido nas plantas controle no dia 0. Para além disso o conteúdo deste aminoácido aumentou nestes *calli* controle com o tempo (quase duplicando ao fim de 21 dias; figura III.38).

O maior incremento do nível deste aminoácido foi verificado para a concentração de 500  $\mu$ M ao fim de 8 dias decrescendo após esse período. Contrariamente, nos *calli* expostos a 5  $\mu$ M o aumento dos níveis de prolina foi progressivo ao longo do tempo (figura III.38).

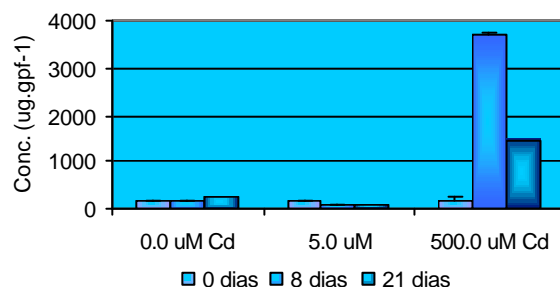
#### A - raiz

8 dias	0	5	500
0		NS	S
5			S
21 dias	0	5	500
0		S	S
5			S



#### B – P. aérea

8 dias	0	5	500
0		S	S
5			S
21 dias	0	5	500
0		S	S
5			S



#### C - Calli

8 dias	0	5	500
0		S	S
5			S
21 dias	0	5	500
0		NS	S
5			S

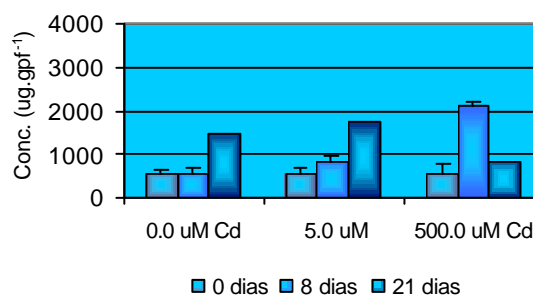


Figura III.38 - Variação da concentração de prolina em *Helianthus annuus* exposta a 0, 5 e 500  $\mu$ M de Cd ao fim de 0, 8, e 21 dias. A – concentração de prolina na raiz ( $p < 0.05$ ; GL=2;  $F = 22.261$ ); B – concentração de prolina na folha ( $p < 0.001$ ; GL=2;  $F = 6740.320$ ); C – concentração de prolina nos *calli* ( $p < 0.001$ ; GL=2;  $F = 10.852$ ). A tabela refere-se ao tratamento estatístico pela ANOVA *one way*; S: significativamente diferente; NS: não significativamente diferente.

Assim aos 8 dias os valores de prolina aumentaram significativamente de forma quase linear (cuja recta  $y = 787.6x - 421.94$  apresenta  $R^2 = 0.8727$ ) em função da concentração de Cd no meio de cultura, variando entre os  $539.32 \pm 79.154 \mu\text{g gpf}^{-1}$  no controlo e os  $2114.52 \pm 250.931 \mu\text{g gpf}^{-1}$  nos tratamentos com Cd  $500 \mu\text{M}$  (figura III.38). Já aos 21 dias os *calli* do lote de  $5 \mu\text{M}$  Cd acumularam níveis de prolina próximos do controlo, enquanto nos *calli* expostos a  $500 \mu\text{M}$  Cd se verificou uma redução deste aminoácido.

## 5.2 Actividade da aminotransferase da ornitina

As actividades de algumas das enzimas envolvidas no metabolismo da prolina, e aqui estudadas, foram significativamente afectadas pela presença de cádmio nos meios de cultura hidropónica e *in vitro*. Assim, observou-se em geral um estímulo das actividades das enzimas responsáveis pela síntese da prolina (OAT e P5Cr) pela presença de Cd no meio (figuras III.39 e III.40), enquanto a oxidase da prolina (interveniente na degradação deste aminoácido) sofreu um decréscimo de actividade.

A actividade da OAT foi afectada pela presença de Cd, embora o seu comportamento seja diferente consoante o órgão da planta e o sistema de cultura. Verificou-se que na raiz apenas a concentração de  $500 \mu\text{M}$  de Cd estimulou (muito ligeiramente) a actividade da enzima. Nas folhas e nos *calli* já foi possível observar um incremento da actividade com o aumento da concentração de Cd. Nos *calli*, para concentrações de  $500 \mu\text{M}$  Cd observou-se um aumento acentuado da actividade desta enzima (cerca de 6x e 5x superior aos 8 e 21 dias de exposição, respectivamente). Para concentrações de  $5 \mu\text{M}$  apenas se observaram aumentos cerca de 2x a 3x superiores aos valores controlo para os mesmos períodos de exposição. Note-se que, nos *calli*, a evolução da expressão da OAT segue um padrão linear cuja equação  $y = 10.26x - 5.3445$  apresenta  $R^2 = 0.9887$  (figura III.39).

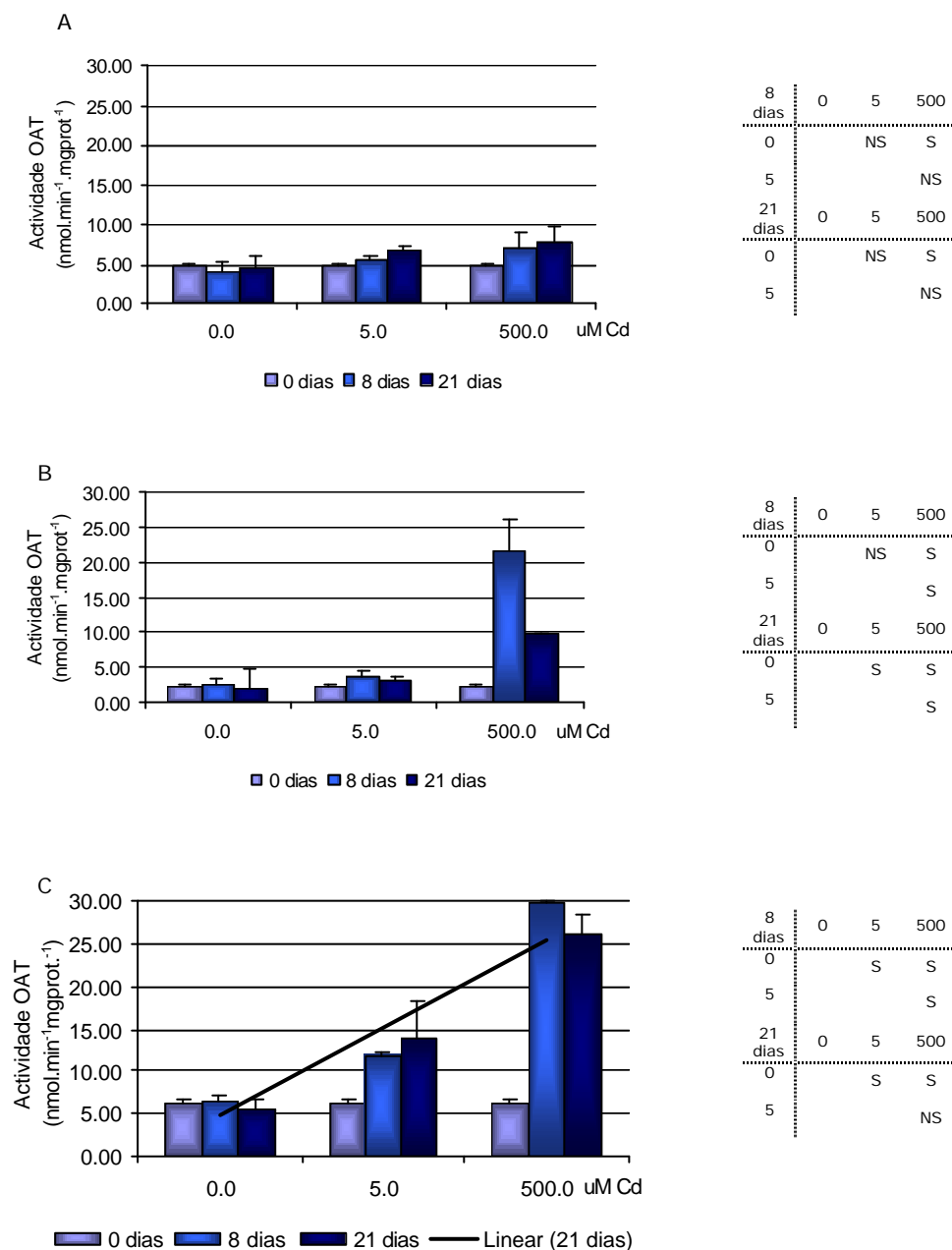


Figura III.39 – Efeito das elevadas concentrações de cádmio na variação da actividade da aminotransferase da ornitina (OAT) aos 0, 8 e 21 dias de exposição ao metal. As tabelas referem se ao tratamento estatístico pela ANOVA *two way* após 8 e 21 dias. A – actividade de OAT na raiz ( $p < 0.05$ ; GL=2;  $F = 7.580$ ); B – actividade de OAT na folha ( $p < 0.001$ ; GL=2;  $F = 24.864$ ); C – actividade de OAT nos *calli* ( $p < 0.001$ ; GL=2;  $F = 28.951$ ); S – significativamente diferente; NS – não significativamente diferente.

### 5.3 Actividade da reductase da pirrolina-5-carboxilato

A actividade desta enzima foi apenas significativamente estimulada nas raízes expostas a 5  $\mu$ M (ao fim de 8 e 21 dias) e na porção aérea exposta a 500  $\mu$ M (ao fim

de 8 dias). Nos *calli* a actividade da reductase da pirrolina-5-carboxilato foi estimulada por diferentes concentrações de Cd, mesmo a de 5  $\mu$ M.

Em *calli* sujeitos ao cádmio, o maior incremento da actividade da P5CR verificou-se nos tratamentos com 500  $\mu$ M de Cd, aos 21 dias de exposição (atingindo cerca de 55 nmol $\cdot$ mgprot $^{-1}$ min $^{-1}$ ).

Saliente-se que a evolução da actividade desta enzima, aos 21 dias de exposição, no tecido caloso segue um padrão linear cuja recta de equação  $y = 15.432x + 7.8662$  apresenta  $R^2 = 0.9897$  (figura III.40) em função da concentração do metal no meio.

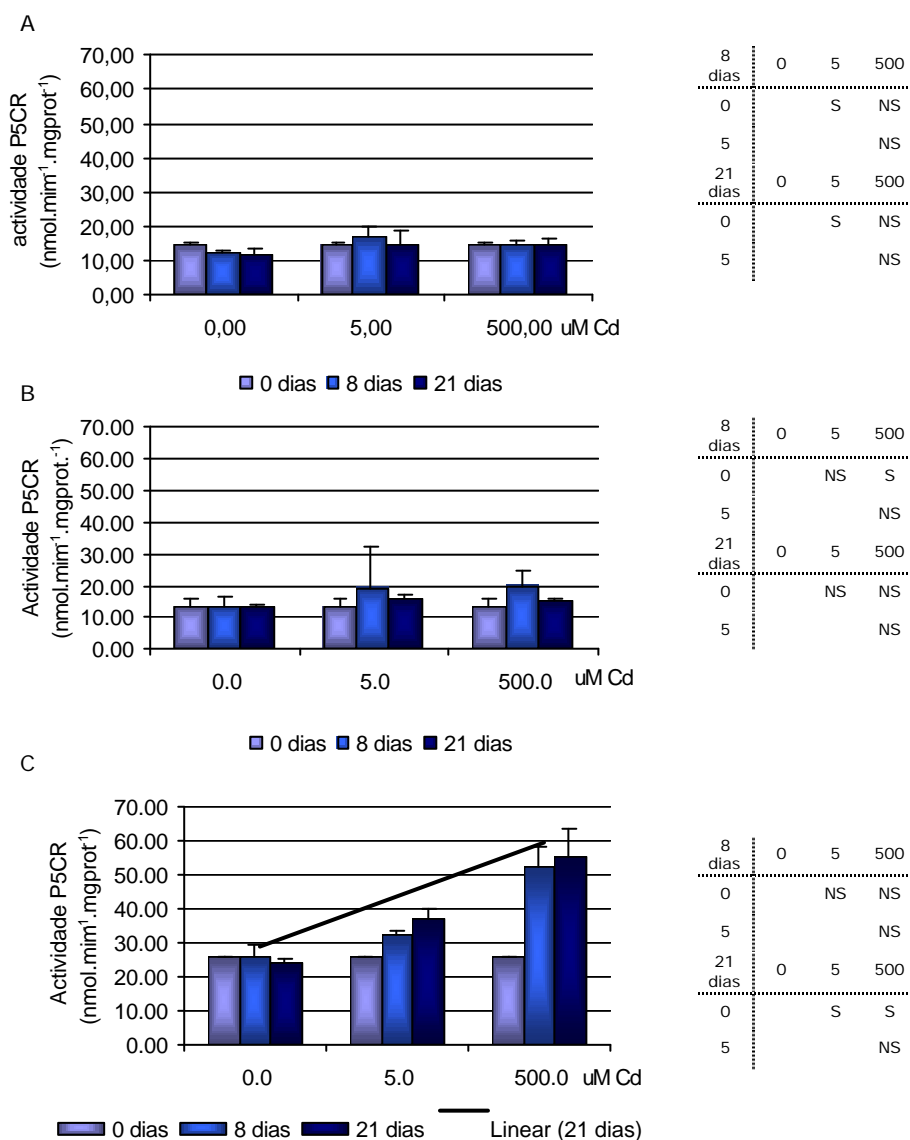


Figura III.40 – Efeito das elevadas concentrações de cádmio na variação da actividade da reductase da pirrolina-5-carboxilato (P5Cr) aos 0, 8 e 21 dias de exposição ao metal. As tabelas referem se ao tratamento estatístico pela ANOVA *two way* após 8 e 21 dias. A – actividade de P5CR na raiz ( $p < 0.05$ ; GL=2;  $F = 4.958$ ); B – actividade de P5CR na folha ( $p < 0.05$ ; GL=2;  $F = 0.316$ ); C – actividade de P5CR nos *calli* ( $p < 0.001$ ; GL=2;  $F = 9.315$ ); S – significativamente diferente; NS – não significativamente diferente. A recta refere-se à relação linear cuja equação  $y = 15.432x + 7.8662$  apresenta  $R^2 = 0.9897$ .

#### 5.4 Actividade da oxidase da prolina

Na raiz esta enzima atingiu o seu máximo de actividade, contrariamente aos resultados obtidos para as enzimas de síntese da prolina cuja actividade, neste órgão, foi muito baixa. A actividade da oxidase da prolina foi, na raiz, estimulada pela exposição a cádmio (figura III.41), atingindo valores máximos ao fim de 21 dias nas raízes expostas a 500  $\mu$ M de cádmio.

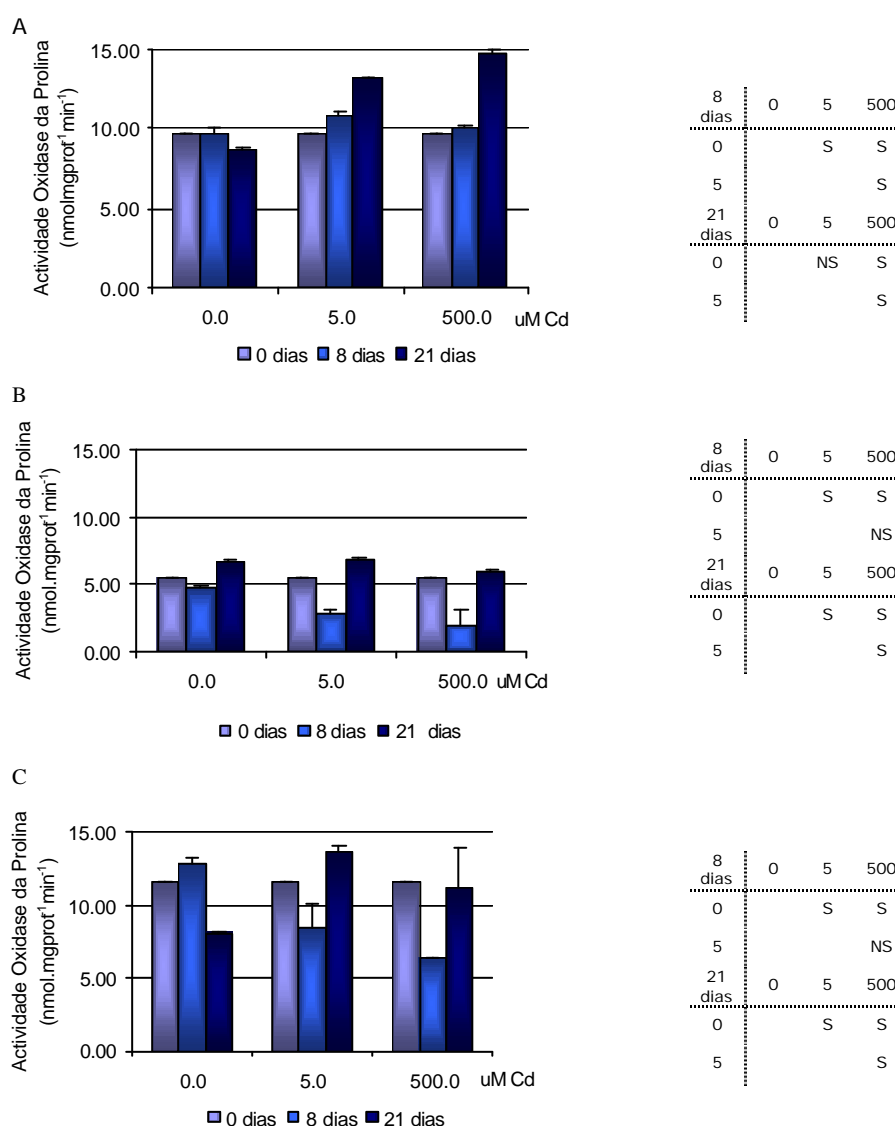


Figura III.41 – Efeito das elevadas concentrações de cádmio na variação da actividade da Oxidase da prolina (OP) aos 0, 8 e 21 dias de exposição ao metal. As tabelas referem se ao tratamento estatístico pela ANOVA *two way* após 8 e 21 dias. A – actividade de OP na raiz ( $p < 0.001$ ; GL=2;  $F = 84.801$ ); B – actividade de OP na folha ( $p < 0.001$ ; GL=2;  $F = 73.899$ ); C – actividade de OP nos *calli* ( $p < 0.05$ ; GL=2;  $F = 5.282$ ); S – significativamente diferente; NS – não significativamente diferente.



Nas folhas foi nítido o decréscimo da actividade desta enzima logo aos 8 dias para as concentrações de 5  $\mu$ M e 500  $\mu$ M, enquanto no final do tratamento a actividade desta enzima voltou a aumentar em todas as condições.

Nos *calli* controlo, esta enzima apresentou um decréscimo de 33% da sua actividade ao fim de 21 dias. Porém aos 8 dias de tratamento foi possível observar um decréscimo linear da sua expressão (figura III.41) em função da concentração de cádmio no meio. A actividade desta enzima, apesar de ter decrescido na primeira semana de stress, voltou a aumentar ao fim de 21 dias de tratamento nos *calli* tratados com cádmio (figura III.41).



## CAPÍTULO IV

### DISCUSSÃO

#### 1 Crescimento e Senescência

São abundantes as referências ao efeito do excesso de cádmio no decréscimo do crescimento das plantas. Por exemplo, Azevedo (1995) refere uma redução de peso seco e peso fresco de alfaces expostas a elevadas concentrações de cádmio (1 a 20 mg Cd/Kg solo). Também em plântulas de *Betula pendulata* verificou-se que, quando expostas até 2  $\mu$ M de cádmio, o crescimento total das plantas era estimulado por cádmio 0,05  $\mu$ M mas era inibido para concentrações de 0,5  $\mu$ M (apesar do estímulo do crescimento da raiz) (Gussarsson, 1994 vide Hagemeyer, 1999). Trivedi *et al.* (2000) referem ainda que o Cd promove maior redução do crescimento do trigo cultivado em meio de cultura enriquecido com potássio, do que outros metais como o chumbo. A redução do crescimento dos diferentes órgãos das plantas não é específica do cádmio e está patente num grande número de trabalhos sobre o efeito de metais nas plantas. A título de exemplo refiram-se Barylá *et al.* (2000) e Lidon (1994) que trabalharam com o efeito do cobre em *Brassica napus* e em *Oryza sativa*, respectivamente: os primeiros mostraram que havia uma redução do crescimento da raiz de *Brassica napus* expostas a concentrações tóxicas de cobre surgindo, nas concentrações mais elevadas, zonas escuras tipicamente necrosadas (Barylá *et al.*, 2000), aspecto também encontrado para as raízes de girassol expostas a cádmio. Também Lidon (1994) refere que o cobre provocou o decréscimo do crescimento de plantas de arroz, para além de inúmeros efeitos na ultraestrutura, metabolismo e fisiologia das plantas (*e.g.* fotossíntese, stress oxidativo).

No nosso trabalho, para além do aspecto da clorose, foi evidente que a exposição a cádmio levava ao desenvolvimento de zonas de necrose nas plantas, assim como ao decréscimo de peso fresco e seco ao longo do tempo. Estes sintomas foram já descritos como presentes e típicos noutras plantas expostas a cádmio e outros metais (para revisão ver Hagemeyer, 1999).

O efeito do cádmio na redução do peso fresco das plantas está patente num extenso trabalho realizado por Inoue *et al.* (1994). Estes autores verificaram que as raízes de dicotiledóneas sofriam uma maior redução de peso fresco do que as de monocotiledóneas quando expostas a cádmio (Inoue *et al.*, 1994 vide Prasad & Hagemeyer, 1999). A generalização destes resultados deve ser feita com cuidado, já



que a produção de matéria seca nas porções aéreas e raízes de plantas de *Triticum aestivum* (monocotiledónea), na presença de cádmio (0-50  $\mu$ M), foi mais afectada (decréscimo de 50% a 5  $\mu$ M Cd) que a de *Lycopersicon esculentum* (dicotiledónea) a crescer nas mesmas condições (onde se deu uma redução de 50% a 10  $\mu$ M) (Hagemeyer, 1999).

Cieslinski *et al.* (1996) verificaram que a adição de cádmio 60  $\mu$ M em plantas de *Fragaria ananassa*, a crescer em areia, reduzia mais acentuadamente o peso seco das porções aéreas do que o das raízes mas, mais de 90% do cádmio acumulava-se nas raízes. Saliente-se, no entanto, que os resultados obtidos (quanto ao crescimento e outros parâmetros de senescência) para uma cultivar/espécie podem não traduzir o comportamento de outras cultivares ou espécies.

Um dos parâmetros mais usados na análise do crescimento de plantas é a taxa de crescimento relativo (RGR) que reflecte a produtividade da planta e dá a taxa de aumento da biomassa relativa à massa produtiva da planta (Hagemeyer, 1999). Em plantas de girassol expostas a Cd, este parâmetro decresceu com a exposição ao metal, podendo este decréscimo estar relacionado com alterações na taxa de assimilação líquida (NAR) e/ou na razão de área foliar (LAR) (Wignarajah, 1990). Por sua vez o decréscimo de NAR pode dever-se a uma redução da taxa fotossintética (acompanhada do decréscimo do conteúdo em clorofilas), e/ou a uma redução da capacidade de usar os compostos produzidos pela fotossíntese no crescimento, ou ainda, a um aumento da utilização destes composto na respiração (Wignarajah, 1990). Por exemplo, Rawson e Munns (1984) mostraram um aumento dos conteúdos de produtos derivados da fotossíntese em plantas de girassol expostos a concentrações excessivas de Na.

Deste estudo ressalta que o cádmio induziu uma redução do peso fresco, seco e, em geral, o crescimento desta cultivar de girassol, confirmando os resultados descritos acima para outras espécies. Estes resultados são também apoiados pelos valores de IC<sub>50</sub> de 439,21  $\mu$ M de Cd, calculados para as plantas, e de 493,52  $\mu$ M de Cd para os *calli*. Estes dados revelam ainda uma maior tolerância do tecido caloso face ao stress induzido por cádmio, do que as plantas de girassol. Estes parâmetros são de extrema importância na avaliação do potencial efeito toxicológico de metais pesados no meio ambiente em geral e nas plantas em particular (Kölh e Losch, 1999). Contudo e dado haver geralmente variações intra-específicas, devem ser realizados estudos com outras cultivares de girassol, uma vez que a extrapolação do comportamento para a espécie *Helianthus annuus*, apenas em função da resposta de um genótipo deve ser encarado com precaução.





Já está relativamente bem estudado para outras espécies que a presença de metais como o cádmio pode interferir com a acumulação/distribuição de elementos minerais essenciais ao desenvolvimento da planta que por sua vez, intervêm nos processos metabólicos (Hagemeyer, 1999). Para além disso, a exposição a iões em quantidades tóxicas leva frequentemente a desequilíbrios osmóticos e dessecação como já foi descrito tipicamente não só para a exposição a iões como Na (Santos e Caldeira, 1999), mas também como metais como Cd (Hagemeyer, 1999). Com efeito, neste trabalho verificou-se que o conteúdo hídrico é afectado negativamente pela presença de Cd na porção aérea e que este decréscimo é acompanhado por um aumento da osmolalidade dos tecidos nas plantas expostas a Cd, bem como do decréscimo do NAR. Assim, seria interessante estudar se os açúcares solúveis (eg. sacarose, glucose e frutose) sofreram variação nas plantas expostas a Cd. Caso isto se verificasse, esta seria uma possível explicação (embora o processo seja muito mais complexo) para a redução do crescimento destas plantas de girassol (Greger *et al.*, 1999).

O efeito do cádmio no crescimento das plantas está também dependente do seu efeito na fotossíntese. O efeito do Cd na fotossíntese torna-se evidente devido à clorose que se observa nas folhas expostas a Cd (5 e 50  $\mu$ M) e ao decréscimo da concentração da *chl a* e *chl b*, o que indica, ou degradação destes pigmentos ou decréscimo da sua síntese. O aumento da razão de *chl a/chl b* pode justificar-se por uma maior degradação inicial da clorofila b pelas clorofilases que, num processo intermédio convertem este pigmento em clorofila a (Fang *et al.*, 1999).

As referências às perturbações do processo fotossintético por parte dos metais pesados são frequentes (para revisão ver Prasad e Strazalka, 1999). Algumas das causas dessas perturbações são, segundo Prasad e Strazalka (1999), a degradação das clorofilas devido ao ataque oxidativo, os danos nas estruturas membranares e proteicas e ainda a substituição dos cofactores em processos fundamentais por metais pesados. A referência à clorose nas folhas de plantas expostas a este e a outros metais tem sido largamente referida (e.g. Dietz *et al.*, 1999; Dubey, 1997). Cite-se, por exemplo, o trabalho de Dubey (1997) em que é referida a inibição da síntese de clorofilas e carotenoides em plantas expostas a Cd. Neste trabalho, a clorose observada no girassol para concentrações inferiores a 500  $\mu$ M (acompanhada pela redução do conteúdo das clorofilas) confirma estas asserções. Contudo, e curiosamente, as folhas das plantas expostas a 500  $\mu$ M não mostraram clorose (também confirmado pelo conteúdo das clorofilas, que é, nesta concentração, similar à das plantas controlo). Por outro lado este aumento de concentração de clorofilas encontrado para 500  $\mu$ M, parece contradizer os resultados obtidos neste trabalho para



concentrações mais baixas, o que em geral é descrito na bibliografia. Este aspecto pode ser apoiado pela hipótese de que o cádmio terá substituído o Mg na clorofila reduzindo a sua funcionalidade e portanto a actividade fotossintética, tal como já foi descrito por Kuper (1996, *vide* Prasad, 1999). Poder-se-á ainda ponderar a possibilidade deste aumento da concentração de clorofilas e da tonalidade das folhas fazerem parte de mecanismos de recuperação nas folhas jovens, que reduzem substancialmente a sua área foliar e a NAR, dado que continuou a verificar-se clorose e necrose nos cotilédones. Já Barceló (1986) encontrou em feijoeiros tratados com Cd, alterações severas na estrutura tilacoidal, que não era evidenciada por clorose nas folhas jovens. Contudo, esta hipótese deverá ser estudada no futuro.

Para além do efeito do cádmio nas clorofilas, este metal pode ainda exercer efeitos na fotofosforilação (envolvendo a cadeia transportadora de electrões nos dois fotossistemas). Verificou-se que nas plantas de girassol, a exposição a concentrações baixas de Cd ( $5 \mu\text{M}$ ) aumenta a fluorescência basal sugerindo assim um aumento da percentagem de energia perdida por fluorescência mesmo quando todos os centros de reacção estão abertos. Por outro lado a fluorescência máxima e a variável sofreram um decréscimo, o que sugere uma degradação do fotossistema II.

No transporte de electrões, vários passos parecem ser sensíveis a ROS (reactive oxygen species), nomeadamente a interacção entre o centro de reacção do PSII e a proteína D1 (Hideg *et al.*, 1994 *vide* Dietz *et al.*, 1999). Como muitas destas proteínas e complexos intervenientes no processo de transferência de electrões estão associados a metais (*e.g.* o complexo de cisão da água está ligado a Mn, assim como a plastocianina está ligada a Cu), a exposição a outros metais pode levar à substituição destes iões, inibindo a fotossíntese (Dietz, 1999).

Para além do efeito na síntese/degradação das clorofilas e na cadeia transportadora de electrões, elevadas concentrações de cádmio podem ter levado também à degradação das membranas tilacoidais e do invólucro plastidial, dado que nas folhas expostas a 50 e 500  $\mu\text{M}$  houve um aumento da produção de malondialdeído, um parâmetro indicador da degradação membranar. Dietz *et al.* (1999) referem que, em plantas expostas a metais pesados, foram encontradas alterações de aspecto/composição das membranas tilacoidais, e conseqüente alteração da fotossíntese.

Este aspecto pode também correlacionar-se com a perda de conteúdo hídrico (desidratação) que as plantas expostas a elevadas concentrações de cádmio apresentavam (este assunto será desenvolvido mais adiante). Finalmente, e embora esteja fora do âmbito deste estudo, convém salientar que o excesso de cádmio também pode afectar a taxa fotossintética através da abertura estomática e assim,



também a taxa de transpiração, aumentando a possibilidade de dessecação por parte da planta (Poschenrieder e Barceló, 1999).

Alguns estudos em plantas de feijoeiro mostraram ainda, que o Cd levou ao aumento da taxa de transpiração e, em situações de ligeiro stress hídrico levou, não só a uma dessecação irreversível, como esta ocorria mais cedo que as mesmas plantas expostas a stress hídrico mas sem cádmio. Este efeito não parece traduzir o efeito de todos os metais, porque o Cr teve efeito inverso aumentando a tolerância das plantas à dessecação (Poschenrieder e Barceló, 1999). Estes dados apontam para o Cd como um factor que reduz a tolerância à secura das plantas (Barceló et al., 1986, 1988), o que corroborou a perda de água encontrada nas porções aéreas de plantas de girassol sujeitas à concentração mais elevada de cádmio.

Para além da degradação das membranas plastidiais, o cádmio pode também afectar outras membranas como o plasmolema e o tonoplasto levando a desequilíbrios osmóticos, pois apesar do mecanismo de osmorregulação ser complexo, a capacidade de manter a integridade da membrana durante a exposição ao metal pesado pode ser essencial para a manutenção do teor hídrico.

A produção de malondialdeído é frequentemente usada como um parâmetro de degradação oxidativa das membranas sendo, desta forma, indicador da integridade membranar. Esta degradação parece estar altamente relacionada com o aumento de radicais “espécies reactivas de oxigénio” (ROS) que atacam lípidos, em particular os ácidos gordos insaturados como o ácido linoléico, muitos deles constituintes das membranas, levando assim a uma degradação membranar (Dietz, 1999).

Embora sejam poucos os estudos na produção de malondialdeído por peroxidação lipídica das membranas em plantas expostas a Cd, alguns estudos focaram alterações na composição da membrana em plantas expostas a este metal (para revisão ver Rama Devi e Prasad, 1999), enquanto outros trabalhos apontaram para um aumento da degradação membranar em plantas quando expostas a cádmio, confirmando assim o que foi encontrado para esta cultivar de girassol.

Por exemplo, a produção de MDA aumentou em alguns segmentos de aveia expostos a Cd (Dietz, 1999), em folhas de girassol incubadas em 0.5 mM Cd, Cu e Fe (Gallego, 1996), em *Brassica napus* sujeita a concentrações crescentes de Cu e ainda em plantas de feijoeiro expostas a 5  $\mu$ M de Cd e a 100  $\mu$ M de Zn (Chaoui et al., 1997). Este aumento de MDA pode assim estar associado, não só com as alterações de eficiência fotossintética observada, mas também com a perda de iões e desidratação encontrada na situação mais drástica de cádmio. Por exemplo, o cádmio decresceu os níveis de potássio nas células, e este desequilíbrio pode ter a ver com alterações de permeabilidade membranar (Chaoui et al., 1997). Contudo, Chaoui et al. (1997)



referem que a associação entre o aumento de MDA e a perda de K encontrada em plantas após a exposição a metais pesados é ainda controversa: enquanto que Pandolfini, *et al.* (1992) encontraram um aumento da libertação de K (Chaoui *et al.*, 1997), em trigo houve aumento de MDA sem ter havido perda de K (Dietz, 1999). Este autor propõe que, o facto de não se ter encontrado correlação em trigo pode estar relacionado com o facto do efluxo de K não se fazer pela fase lipídica da membrana (Dietz, 1999) mas por canais cuja abertura pode ser alterada pela presença de Cd (Murphy e Taiz, 1997, *vide* Dietz, 1999).

Um outro parâmetro largamente usado na avaliação de senescência é o conteúdo em proteínas solúveis (Chen, *et al.*, 1996) (Lutts *et al.*, 1996). Normalmente um decréscimo do conteúdo destas proteínas é um indicador de que a proteólise se iniciou, podendo levar ao aumento do conteúdo de aminoácidos livres, e estando frequentemente relacionado com o aumento dos níveis de amónio nas células, um elemento altamente tóxico. Verificou-se que o Cd levou ao decréscimo das proteínas solúveis, o que pode indicar o desencadear de processos de proteólise nestas células. Dado que a rubisco existe em quantidades bastante elevadas nas células, seria interessante quantificar a concentração desta enzima assim como a sua actividade nas plantas expostas a stress, complementando assim a informação disponível sobre o efeito deste metal na fotossíntese.

## 2 Desequilíbrios nutricionais

O cádmio afectou a acumulação de nutrientes, sendo este efeito mais evidente nas plantas que nos *calli* de girassol. Alguns estudos sobre o efeito do excesso de metais pesados como o Cd, Zn, Mo, ou Ni em concentrações que afectam o crescimento radicular, mostraram que estes metais também afectam a acumulação de alguns micronutrientes (Dietz, 1999). Outros estudos mostraram que o Cd induziu sintomas semelhantes aos de deficiência em Fe (Siedlecka e Krupa, 1996 *vide* Dietz, 1999). Esta interacção, e consequente deficiência de alguns nutrientes, pode no caso destes serem envolvidos como cofactores em processos de desintoxicação enzimática de radicais livres ou ROS, levar a um aumento de degradações induzidas por stress oxidativo (Dietz, 1999).

Em *Betula pendulata* verificou-se que plântulas expostas a  $2 \mu\text{M}$  de Cd apresentavam decréscimos de K, Ca, Mg e Mn enquanto o Cd e Mo aumentaram, 8 dias após a exposição. O Cd acumulou-se particularmente nas raízes. O crescimento



total da planta foi estimulado por Cd 0,05  $\mu$ M mas reduziu-se para concentrações de 0,5  $\mu$ M (apesar do estímulo do crescimento da raiz).

Na cultivar de girassol em estudo, o Cd parece não interferir com a absorção e/ou acumulação de Mg independentemente do órgão da planta, assim como do sistema de cultura (planta intacta ou tecido caloso). No entanto, na concentração de 500  $\mu$ M verifica-se uma aparente redução da concentração de Mg na raiz (embora não seja estatisticamente significativo pela ANOVA) que é contraposto por um aumento aparente da concentração de Mg na porção aérea.

O conteúdo de K é significativamente afectado pela presença de Cd em grandes concentrações, verificando-se um decréscimo do seu conteúdo na raiz, logo ao fim de 8 dias de tratamento, enquanto que o decréscimo observado na porção aérea só é evidente a partir dos 15 dias de tratamento. Estes resultados parecem indicar que, e dada a forte mobilidade do K na planta, esta é capaz de translocá-lo para a porção aérea com eficiência durante os primeiros 15 dias, apesar de se verificar uma hipotética redução da absorção de K pela raiz durante este período. Só a partir deste momento é que o conteúdo de K baixará para níveis que a planta já não consegue translocar para a porção aérea quantidades similares às do controlo. Seria interessante realizar ensaios mais aprofundados sobre a adição suplementar de potássio na presença de cádmio.

Os níveis de cálcio foram afectados na porção aérea embora só no final do tratamento. Tendo em conta a grande importância que este ião tem em inúmeras funções, como na divisão celular e constituição de novas paredes, quer no alongamento, quer como mensageiro secundário de numerosos processos, quer ainda na estabilidade da membranas celulares, este decréscimo pode justificar a redução do crescimento /alongamento das plantas.

Relativamente ao P, uma análise mais detalhada dos dados permite verificar um decréscimo dos níveis de P na raiz durante os primeiros 15 dias, embora ao fim de 21 dias esta diferença não seja significativa. Este decréscimo, observado nos primeiros dias de tratamento, não foi acompanhado por uma redução de P na porção aérea, o que parece indicar que, tal como para o K, o P é mobilizado rapidamente para a porção aérea da planta. Esta mobilização é relevante dadas as funções importantes do P, nomeadamente como constituinte de ácidos nucleicos e de ADP/ATP molécula fundamental para o decorrer de processos energéticos da célula.

A análise de Zn revela um aparente decréscimo deste ião na raiz até aos 8 dias, o que parece estar de acordo com o facto deste ião entrar em competição com o Cd. Contudo verifica-se que, estatisticamente as concentrações de Zn observadas na raiz não diferem consoante a quantidade de cádmio nem com o tempo de exposição.



Seria interessante verificar o comportamento de outras cultivares de girassol no que diz respeito ao efeito do cádmio na absorção/acumulação de Zn e outros micronutrientes

A exposição a Cd não parece levar a alterações significativas da concentração de B nesta planta. Dado o Boro ser um micronutriente fundamental na divisão celular e consequentemente no crescimento, o decréscimo inicial da sua acumulação na raiz pode apoiar o reduzido crescimento desta nas culturas hidropónicas, principalmente nas plantas tratadas com 5 e 500  $\mu$ M Cd.

A presença de cádmio no meio de cultura, independentemente do sistema em causa (hidropónica ou cultura *in vitro*), afecta a acumulação e translocação deste mesmo ião nos diferentes órgãos e tecidos de *Helianthus annuus*.

Com o aumento da concentração de Cd verifica-se que este também é acumulado nas porções aéreas, embora em quantidades menores que na raiz. No entanto, é apenas para as plantas expostas a 500  $\mu$ M de Cd que a acumulação deste metal pesado é evidente na porção aérea da planta, bem como nos *calli*. Hagemeyer (1999) refere como valor médio para o Cd nas plantas entre 0,05-0,2  $\mu$ g/g de tecido, podendo contudo ser muito superior em função dos locais serem ou não contaminados, mas nas raízes das plantas de girassol expostas a 500  $\mu$ M foram encontrados valores de aproximadamente 80 mg/gps, cerca de dez vezes superior aos valores encontrados para a porção aérea e para os *calli*.

Comment:

Um dos aspectos mais importantes para a tolerância desta cultivar pode relacionar-se com a não acumulação deste metal na porção aérea, protegendo assim o sistema fotossintético (Greger, 1999)

Como foi dito anteriormente a classificação das plantas em acumuladoras, indicadoras ou exclusoras é frequentemente complexa. Numa tentativa de fazer um agrupamento por famílias, Kuboi *et al.* (1986; 1987) agrupou 34 espécies (9 famílias) em: pouco acumuladoras (Leguminosas), medianamente acumuladoras (Gramíneas, Liliáceas, Curcubitáceas e Umbelíferas), e altamente acumuladoras onde incluiu as Compostas (família do girassol) juntamente com as Chenopodiaceae, Solanaceae e Cruciferae. Esta classificação é contudo (e de acordo com Fergusson, 1990) controversa, pois por exemplo, dentro das cultivares/variedades de uma mesma espécie pode haver grande variabilidade de capacidade de acumulação (Greger, 1999). Tal facto foi demonstrado para diferentes genótipos de alface (Azevedo, 1995) e para *Salix viminalis* (Greger, 1999) não tendo estes últimos autores encontrado uma correlação entre a distribuição do Cd na planta e o grau de tolerância (Landberg e Greger 1996 vide Greger, 1999). Por outro lado, esta capacidade de absorção e acumulação pode variar com a idade da planta.



No nosso trabalho, a relação linear encontrada para os vários órgãos da planta e para os *calli* ( $R^2 > 0,99$ ) revela o carácter indicador desta cultivar, segundo o sistema de classificação definido por Baker (1981). Porém, será prematuro afirmar, dado que a maioria das Compostas apresentam um comportamento acumulador, que *Helianthus annuus* L. é uma espécie bioindicadora da presença de metais pesados. Seria conveniente, em estudos futuros, alargar os ensaios de toxicidade a outras cultivares e a outros metais pesados.

### 3 Metabolismo da prolina

Um dos parâmetros mais usados como indicador de stress nas plantas, tem sido a acumulação de prolina (e.g. Ferreira *et al.*, 1998; Hartug e Davies, 1994; Madan *et al.*, 1995). Aumentos de prolina têm sido descritos por outros autores em resposta a metais pesados (Kastori *et al.*, 1992; Bassi e Sharma, 1993; Chen e Kao 1995; Schat *et al.*, 1997). Por exemplo, a exposição a 76  $\mu$ M de Zn causou um aumento de 150% do conteúdo de prolina em *Lemna minor*. O cobre numa concentração similar (79  $\mu$ M) foi ainda mais eficaz com aumentos de 300%. Resultados semelhantes foram encontrados para plantas de trigo (Bassi e Sharma, 1993) e de girassol expostos a Zn e Cu (Kastori *et al.*, 1992). Estes resultados confirmam o aumento de níveis de prolina encontrados para os diferentes órgãos da planta e para os *calli* de girassol expostos a Cd. Enquanto que na raiz o maior aumento se verificou, ao fim de 21 dias, para a concentração de 5  $\mu$ M, nas porções aéreas este aumento foi maior para a concentração de 500  $\mu$ M, mostrando que os órgãos têm diferentes capacidades de resposta às concentrações de cádmio. Este aumento de conteúdo de prolina teve origem num estímulo da actividade da P5C reductase e da OAT, acompanhado por um decréscimo da oxidase da prolina. Resultados similares já foram descritos para plantas e *calli* deste genótipo quando expostos a elevadas concentrações de sulfato de sódio (Santos *et al.*, 2001b).

Assim, dos resultados obtidos, ressalta que a exposição a cádmio aumentou os níveis de prolina, tal como já tinha sido descrito por outros autores (Kastori *et al.*, 1992; Bassi e Sharma, 1993; Chen e Kao 1995; Schat *et al.*, 1997). Este aumento é confirmado pelo incremento de actividades das P5Cr e OAT, e pelo decréscimo da oxidase da prolina.

A acção protectora da prolina em resposta a inúmeras situações de stress, apesar de bastante estudada é ainda relativamente controversa (Ronde *et al.*, 2000),



dado que não é consensual que um aumento de prolina leve a um aumento de tolerância ao stress.

Estes dados sugerem que o cádmio tem efeito no metabolismo da prolina, embora diferente entre os *calli* e as plantas, dado que nos *calli* a concentração de prolina não só foi, por regra superior à concentração na planta, como também aumentou com o tempo. Por outro lado, nos *calli* a exposição a cádmio, apesar de não ter levado a aumentos tão grandes como os observados nas folhas, levou, (na exposição a 5  $\mu$ M) a um aumento gradual da concentração de prolina, enquanto que na concentração mais elevada o grande aumento foi a curto prazo (8 dias), decrescendo após este período.

O aumento dos níveis de prolina nos *calli* foi linear com o aumento de cádmio no meio ( $Y = 787.6x - 421.94$ ), tendendo a decrescer com o tempo nas concentrações de cádmio mais elevadas. Contrariamente, nas porções aéreas de plantas intactas apenas se registou um aumento dos níveis de prolina na concentração mais elevada, havendo também um decréscimo com o tempo, o que leva a supor que a prolina é um mecanismo de resposta de grande importância nos primeiros dias, mas que decresce com o tempo de exposição das células ao metal. Note-se que, a fraca mobilidade deste metal na planta e a sua acumulação preferencial na raiz pode relacionar-se com este facto, visto que a prolina só se acumulou na porção aérea (mais concretamente na folha) a partir dos 21 dias de exposição ao metal. Assim o mecanismo de recuperação nas folhas apareceu mais tardiamente. Por outro lado, verificou-se um decréscimo dos níveis de prolina (em folhas e *calli*) ao fim de 21 dias na concentração mais elevada e este pode ter a ver com um decréscimo das actividades da OAT nestas condições, e um acentuado aumento da oxidase da prolina.

O cádmio também estimulou a actividade da OAT, uma enzima envolvida numa das possíveis vias de síntese da prolina. Aqui os *calli* e as porções aéreas mostraram a maior resposta, com estímulo da actividade desta enzima mesmo para baixas concentrações de cádmio (5  $\mu$ M) no final do tratamento. A maior actividade da P5Cr e da OAT nos *calli* pode justificar a maior concentração de prolina que os *calli* em geral apresentaram face às plantas intactas.

Curiosamente a actividade da oxidase da prolina também foi estimulada para certas situações de stress, sobretudo na raiz, onde apesar dum ligeiro aumento das actividades das P5C reductase e OAT, o aumento da concentração de prolina foi reduzido. Nas porções aéreas e nos *calli* expostos a cádmio verificou-se em geral uma redução significativa da actividade da oxidase da prolina enquanto a P5Cr e a OAT aumentavam. Estes resultados corroboram os resultados obtidos para a prolina uma





vez que os níveis deste aminoácido aumentaram, em geral, com a exposição a cádmio.

O aumento da actividade da P5C reductase foi já referida para outras situações de stress como o NaCl ou stress osmótico (Kohl *et al.*, 1990, Madan *et al.*, 1995, Ramanjulu e Sudhakar, 2000; Ronde *et al.*, 2000). Contudo, a via de síntese da prolina não está ainda confirmado parecendo variar com a espécie. A síntese da prolina pode ocorrer via glutamato (envolvendo a P5C sintetase) ou via ornitina (envolvendo a OAT) mas a verdadeira contribuição da via da OAT parece variar com as espécies. No girassol, esta enzima revelou uma maior estimulação da actividade que a P5Cr pela exposição a cádmio, quer em plantas quer em *calli*. Estes aumentos das actividades de enzimas envolvidas na síntese da prolina e o decréscimo da actividade de uma enzima envolvida no seu catabolismo apoiam os aumentos de conteúdo da prolina nas células em ambos os sistemas de cultura.

As diferenças observadas entre plantas e *calli* pela exposição a cádmio, podem ser influenciadas pelas características inerentes a cada sistema de cultura usado (plantas intactas vs. *callus*): assim, e como propôs Smith e McComb (1981) os *calli* ao crescerem em meios de cultura, à partida ricos em sais, podem também estar mais adaptados a excesso de sais. Por outro lado uma situação de deficiência de um nutriente por excesso de um metal (*e.g.* Cd) pode ser mais difícil de ser observado em *calli* que crescem em meios de cultura em que os nutrientes estão em concentrações elevadas.

Os *calli* de girassol são mais tolerantes do que as células das plantas intactas. A extrapolação desta afirmação para o girassol em geral deve ser contudo encarada com cuidado pois deveriam ser realizados mais ensaios comparativos com outras cultivares. Por outro lado, ao mostrar uma maior resistência que as plantas intactas, os *calli* revelam que não são um adequado modelo (alternativo às plantas intactas) de rastreio para metais, como foi proposto para outras espécies e para outros agentes de stress (*e.g.* NaCl), em que os *calli* apresentaram um comportamento similar ao das plantas intactas.

Por último, este resultado abre perspectivas para a selecção de *calli* adaptados a este metal pesado que possam originar (por organogénese e/ou embriogénese – sistemas de regeneração *in vitro* de girassol, já bem estabelecidos neste laboratório (C. Santos 2000, com pessoal), com vista a obter, no futuro, plantas tolerantes e acumuladoras de forma a serem usadas na fitorremediação e descontaminação de ecossistemas.

Outros fenómenos envolvidos na resposta/tolerância ao cádmio relacionam-se com parâmetros extremamente importantes, mas que estão fora do âmbito deste



trabalho, como os compostos de ligação/complexação destes metais, ou com a síntese de compostos extremamente importantes como as fitoquelatinas. Também os processos enzimáticos envolvidos em processos de destoxificação são importantes componentes na células envolvidos na resistência desta a níveis elevados de metais pesados. Embora estes fenómenos não tenham sido abordados neste trabalho, impõe-se, em trabalhos seguintes, enveredar por estas áreas.

---

## CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível constatar que o cádmio tem um efeito tóxico em plantas e *calli* de *Helianthus annuus* L. As concentrações de cádmio utilizadas nos ensaios permitem, por um lado, averiguar os efeitos de baixas concentrações, permitindo assim observar alguns dos mecanismos de recuperação da plantas e *calli* ao stress com metais pesados. Por outro lado, as elevadas concentrações permitiram também verificar os efeitos significativamente tóxicos para a espécie em causa.

A concentrações de 5 e 50  $\mu$ M de Cd a planta manifesta indícios de senescência o que é evidenciado, nomeadamente pela redução do seu crescimento, da síntese de clorofilas e consequentemente da eficiência fotossintética. Os níveis de proteínas solúveis também foram ligeiramente afectados assim como a integridade membranas.

Nas concentrações mais elevadas de cádmio as plantas e os *calli* já têm dificuldade em desenvolver mecanismos de destoxificação, pelo que são evidentes os sintomas de necrose e degenerescência das plantas e *calli*.

O cádmio afectou também o equilíbrio nutricional em ambos os sistemas de cultura, tendo sido evidente a redução da acumulação de K e Ca nas células. Por sua vez o cádmio teve um processo de acumulação progressivamente crescente ao longo do tempo de exposição.

A acumulação de prolina e o seu metabolismo foi afectado pelo metal pesado, visto que se verificou um aumento da acumulação deste aminoácido nas plantas assim como um aumento da actividade das enzimas de síntese e decréscimo da actividade da oxidase da prolina, o que permite supor o envolvimento da prolina nos mecanismos de remediação ao stress por este metal pesado.

Os *calli* de girassol apresentaram um comportamento ligeiramente diferente dos órgãos da plantas expostos ao stress por Cd. Estes revelam uma mais tolerância ao metal, facto este que pode abrir perspectivas para a selecção de células tolerantes a cádmio.

Esta espécie apresenta uma capacidade de acumulação face ao cádmio, pelo que poderia ser eventualmente, e após estudos mais detalhados, usada em ensaios de toxicidade por metais como espécie bioindicadora.

Saliente-se que, para perceber melhor a adaptação ao stress de cádmio e o seus efeitos tóxicos, seria conveniente averiguar outros importantes factores que poderiam ser relevantes, tais como o percurso e a distribuição deste metal nos diferentes órgãos da planta, a produção de fitoquelatinas e mesmo a expressão dos genes envolvidos na

---

regulação do metabolismo da prolina nestas condições. Contudo, estes serão estudos interessantes de serem conduzidos em investigações futuras nesta área.

## BIBLIOGRAFIA

- ? Arnon, D., I., (1949) – Copper enzymes in isolated chloroplasts-Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* – Plant Physiology, 24: 1-10;
- ? Azevedo, H. M. O., (1995), Absorção e acumulação de cádmio em três cultivares de *Lactuca sativa* L. – Tese de mestrado - Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa;
- ? Baker, A.J.M., (1981) – Accumulators and excluders strategies in the plants to heavy metals.- Journal of Plant Nutrition – 3 (1-4): 643-654;
- ? Bassi, R., Sharma, SS., (1993) – Change in proline content accompanying the uptake of zinc and copper by *Lemna minor*. Ann. Bot. 72: 151-154;
- ? Baszynski, T., Wadja, L., Krol, M., Wolinska, D., Krupa, Z., Tukendorf, A., (1980), Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants – Physiol. Plant., Vol. 48: 365-370;
- ? Barceló, J., Poschenrieder, C., Gunsé B., (1986) – Water relation of Chromium IV, treated bush bean plants. Under both normal and water stress condition. J. Exp. Bot. 37: 178-187;
- ? Barceló, J., Poschenrieder, C., Vasquez, M.D., Gunsé B., (1988) – Synergism between cadmium ion stress and drought. In Ozturk MA (Ed) Plants and pollutants in developed developing countries. Ege University Press, Uzmir, pp 529-544;
- ? Barylá, A., Laborde, C., Montillet, J.L., Triantaphyllides, C., Chagvardieff, P., (2000), Evaluation of lipid peroxidation as a toxicity bioassay for plants exposed to copper – Environmental Pollution, 109: 131-135;
- ? Boni, R., Castriotti, G., Napucci, R., Sodiuni, G., (1981) Food perspectives of sunflower protein products. Helia 4: 59-65;
- ? Bonnet, M., Camares, O., Veisseire, P., (2000), Effect of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, Chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo) – Journal of Experimental Botany, Vol. 51, n.º 346: 945-953;
- ? Cataldo, D., Garland, T., Wildung, R., (1983), Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants – Plant Physiol. Vol. 73:844-848;
- ? Chaoui, A., Ghorbal, M., Ferjani, E., (1997), Effects of cadmium- zinc interactions on hydroponically grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.) – Plant Science, Vol. 126 (1): 21-28;
- ? Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghordal, M., Ferjani, E., (1997), Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzymes activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) – Plant Science, Vol. 127 (2): 139-147;
- ? Chen, S., Kao, C., (1995) – Cd induces change in proline levels and peroxidase activity in roots of rice seedlings – Plant Growth Regul. 17: 67-71;



- 
- ? Chen, S., Kao, C., (1996), Ammonium accumulation in reaction to senescence of detached maize leaves – Bot. Bull. Acad. Sin., Vol. 37(4): 255-259;
  - ? Chien, H., Kao, C., (2000), Accumulation of ammonium in rice leaves in response to excess cadmium – Plant Science, Vol. 156 (1): 111-115;
  - ? Costa, G. e Spitz, E., (1997) (Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free aminoacids, protein content of in vitro cultured *Lupinus albus* - Plant Science, Vol. 128 (2): 131-140;
  - ? Dietz, K., J., Baier, M., Krämer, U., (1999), Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants - Heavy Metal Stress in Plants, From Molecules to Ecosystems, Prasad & Hagemeyer Eds;
  - ? Duball, S e Wild, A., Investigation on the Nitrogen Metabolism of spruce Needles in relation to the occurrence of novel forest decline – Journal Plant. Physiol., vol. 132:491-498;
  - ? Fang, Z., Bouwkamp, J.C., Solomos, T., (1998) – Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. J. Rexp. Bot. 49: 503-510;
  - ? Ferreira, C., Vieira Santos, C.L., Sousa A, e Caldeira, G., (1998) – The effects of high levels of Hg on senescence, proline accumulation and stress enzymes activities of maize plants. Agrochimica 42/5: 208-218;
  - ? Fergusson, J.E. (1990) – The Heavy Elements: Chemistry Environmental Impact and Health Effects – Pergamon Press, U.K.
  - ? Filipescu, H., Stoenescu, F. (1981) – Fatty acid composition and relation to oil content in sunflower cultivars tested in international FAO. Helia4: 29-36;
  - ? Galllego, S.M., Benavides, M. P., Tomaro, M.L., (1996), Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress – Plant Science 121: 151-159;
  - ? Greger, M. e Lindberg, S., (1986), Effects of  $Cd^{2+}$  and EDTA on young sugar beets (*Beta vulgaris*) I.  $Cd^{2+}$  uptake and sugar accumulation – Physiol. Plant., Vol 66: 69-74;
  - ? Greger, M. e Lindberg, S., (1987), Effects of  $Cd^{2+}$  and EDTA on young sugar beets (*Beta vulgaris*) II. Net uptake and distribution of  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  – Physiol. Plant., Vol 66: 69-74;
  - ? Greger, M., Bertell, G., (1992), Effect of  $Ca^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  on the carbohydrate metabolism in sugar beet (*Beta vulgaris*) – Journal of Experimental Botany, Vol. 43, n° 247: 167-173;
  - ? Greger, M., Landberg, T., (1995) – Cadmium accumulation in *Salix* in relation to cadmium concentration to the soil. Vattenfall utveckling AB 1995/9;
  - ? Greger, M., (1999), Metal availability and bioconcentration in plants – Heavy Metal Stress in Plants, From Molecules to Ecosystems, Prasad & Hagemeyer Eds;
-

- 
- ? Hagemeyer, J., (1999), Ecophysiology of plants growth under heavy metal stress, Heavy Metal Stress in Plants, From Molecules to Ecosystems, Prasad & Hagemeyer Eds;
  - ? Hartung, W., Davies, W.J., (1994) – Abscissic acid under drought and salt stress. In Pessarakli M. (Ed) handbook of Plant Stress; Dekker, New York, pp 401-411;
  - ? Hernandez, L., Rodriguez, E., Gárate, A., Carpena-Ruiz, R., (1998) Influence of cadmium on the uptake, tissue accumulation and subcellular distribution of manganese in pea seedlings – Plant Science, Vol. 132 (2): 139-151;
  - ? Inouhe, M., Ninomiya S., Tohoyama, H., Joho, M., Murayama, T., (1994) – Different characteristics of roots in the cadmium-tolerance and Cd-binding complex formation between mono and dicotyledonous plants – J. Plants Res. 107:201-207;
  - ? Jackson, P., Unkefer, P., Delhaize, E. Robinson, N., Mechanisms of trace metal tolerance in plants - in Environmental injury to plants – Katterman, F., (1990) Academic press;
  - ? Karaki, G., Clark, R., Sullivan, C., (1996), Phosphorus nutrition and water stress effects on proline accumulation in Sorghum and Bean – J. Plant Physiology, Vol. 148: 745-751;
  - ? Kastori, R., Petrovic, M., Petrovic, N., (1992) – Effects of excess lead, cadmium, copper and zinc on water relations in sunflower. J. Plant Nutr. 15: 2427-2439;
  - ? Kerwer, A., Schafer, H., Heiss, S., Walter, C., Rausch, T., (1999), Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis – Journal of Experimental Botany, Vol. 59, n°. 341: 1827-1835;
  - ? Köhl, K.I., Lösch, R., (1999), Experimental characterization of heavy metal tolerance in plants - - Heavy Metal Stress in Plants, From Molecules to Ecosystems, Prasad & Hagemeyer Eds;
  - ? Krupa, Z., (1988), Cadmium-induced changes in the composition and structure of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex II in radish cotyledons – Physiologia Plantarum, Vol. 73:518-524;
  - ? Krupa, Z., Moniak, M., (1998), The stage of leaf maturity implicates the response of the photosynthetic apparatus to cadmium toxicity – Plant Science, Vol. 138 (2): 149-156;
  - ? Kuboi, T. Noguchi, A., Yazaki, J. (1986) Family Dependent Cadmium Accumulation Characteristics in Higher Plants – Plants and Soil 92: 405-415;
  - ? Kupper H., Kupper, F., Spiller M., (1996) – Environmental relevance of heavy-metal-substituted chlorophylls using the example of water plants – J. Exp. Bot 47: 259-266;
  - ? Kuznetsov, V.I. e Shevyakova, N.I., (1999) – proline under stress: biological role, metabolism and regulation – Reviews- Russian Journal of Plant Physiology Vol. 46, n°. 2: 274-287;
-

- 
- ? Larsson, E., Bornman, J., Asp, H., (1998), influence of UV-B radiation and  $\text{Cd}^{2+}$  on chlorophyll fluorescence, growth and nutrient content – Journal of Experimental Botany, Vol. 49 n° 323,: 1031-1039;
  - ? Lidon, F. J. C., (1993), Efeito do excesso do cobre em plantas de arroz – aspectos bioquímicos, fisiológicos e ultraestruturais – Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa;
  - ? Lin C., Kao, C., (1996), Proline accumulation is associated with inhibition of rice seedling root growth caused by NaCl – Plant Science, Vol. 114 (2): 121-128;
  - ? Lindberg, S., Wingstrand, G., (1985), Mechanism for  $\text{Cd}^{2+}$  inhibition of ( $\text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$ ) ATPase activity and  $\text{K}^+$  ( $^{86}\text{Rb}^{2+}$ ) uptake join roots of sugar beet (*Beta vulgaris*) – Physiol. Plant. Vol. 83: 181-186;
  - ? Lutts, S., Kinet, J., Bouharmont, J., (1996), NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance – Annals of Botany, Vol. 78: 389-398;
  - ? Madan, S., Nainawatee, H., Jain, R., Chowdhury, J., (1995), Proline and proline metabolising enzymes in vitro selected NaCl- tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress – Annals of Botany, Vol. 76: 51-57;
  - ? Martinez, C. Maestri, M. Lani, E., (1996), In vitro salt tolerance and proline accumulation in Andean potato (*Solanum* spp) differing in frost resistance – Plant Science, Vol. 116 (2): 177-184;
  - ? Murashige, T., Skoog, F., (1962) – A revide medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures - Physiology Plant. 15: 473-497;
  - ? Pereira Coutinho, A.X., (1974) – Flora de Portugal. (Ed. R.T, Palhinha) Vergal V. Cramer, pp 738;
  - ? Polar, E., Kuçukcezzar, R., (1996), Influence of some metal chelators and light regimeson bioaccumulation and toxicity of  $\text{Cd}^{2+}$  in duckweed (*Lemna gibba*) – Physiol. Plant. Vol. 66: 87-93;
  - ? Polit, E., ki, T., (1997), Difference in sensitivity of the photosynthetic apparatus in Cd stressed runner bean plants in relation to their age – Plant Science, Vol. 128 (1): 11-21;
  - ? Poschenrieder, C., Gunsé, B., Barceló, J., (1989), Influence of cadmium on water relation, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves – Plant Physiol., Vol. 90: 1365-1371;
  - ? Poschenrieder, C., Barceló, J., (1999) Water relations in heavy metal stressed plants - Heavy Metal Stress in Plants, From Molecules to Ecosystems, Prasad & Hagemeyer Eds;
  - ? Prasad, M., (1995), Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants- Environmental and experimental Botany, Vol.35 (4): 525-545;
  - ? Prasad, M.N.V., Strazalka, K., (1999) - Heavy Metal Stress in Plants, From Molecules to Ecosystems, Prasad & Hagemeyer Eds;
-





- 
- ? Prasad, M.N.V., Strazalka, K., (1999), Impact of heavy metals on Photosynthesis - Heavy Metal Stress in Plants, From Molecules to Ecosystems, Prasad & Hagemeyer Eds;
  - ? Quirino, B.F., Noh, Y.S., Himelblau, E., Amasino, R.M., (2000) – Molecular Aspects of Leaf Senescence. *Trends in Plant Science* – Vol. 5, n.º 7: 278-282;
  - ? Rama Devi, S., Prasad, M.N.V., (1999), Membrane Lipid alterations in heavy metal exposed plants - Heavy Metal Stress in Plants, From Molecules to Ecosystems, Prasad & Hagemeyer Eds;
  - ? Radoti, K., Du, T., Mutavd, D.; (2000), Change in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentration of cadmium - *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 44 (2): 105-113;
  - ? Rengel, Z., (1999), heavy metal as essential nutrient - Heavy Metal Stress in Plants, From Molecules to Ecosystems, Prasad & Hagemeyer Eds;
  - ? Ronde, J.A, Spreeth, M., H., Cress, W.A, (2000) – Effect of antisense L-delta-pyrroline-5-carboxylate-reductase transgenic soybean plants subject to osmotic and drought stress – *Plant Growth Reg.* 32 (1): 13-26;
  - ? Sampaio, J.A., a Cultura de Girassol. (Ed. Instituto de estruturas agrárias e Desenvolvimento Rural – Ministério da Agricultura), Lisboa;
  - ? Santos, M. C. V. L. (1998), Estudo de alguns mecanismos de regulação osmótica e da expressão da glutamina sintetase em células de *Helianthus annuus* L. sujeitas a stress salino: Selecção de células tolerantes a NaCl – Tese de Doutoramento - Departamento de Biologia - Universidade de Aveiro, Aveiro;
  - ? Santos, C. e Caldeira G., (1999) – Comparative response of *Helianthus annuus* plants and *calli* exposed to NaCl: I growth rate and osmotic regulation in intact plants and calli – *Journal of Plant Physiology*, Vol. 155: 769-777;
  - ? Santos, C., Campos, A., Azevedo, H., Caldeira, G., (2000) *In situ* and *in vitro* senescence induced by KCl stress: nutritional imbalance lipid peroxidation and antioxidant metabolism – *J. Exp. Botany Bot. Feb.* Vol.52, nº 335:351-360;
  - ? Santos, C, Gomes, S., Caldeira G., (2000) – Comparative response of *Helianthus annuus* plants and *calli* exposed to NaCl: II Selection of stable tolerant calli cell lines and evaluation of osmotic adjustment and morphogenic capacity– *Journal of Plant Physiology*, Vol. 156: 68-74;
  - ? Santos, C., Falcão, I., Pinto, G.,– Response of adapted and non-adapted sunflower cells to Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: I. Osmotic adjustment and nutrient response and proline metabolism in sunflower under Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stress (submetido a *J. Plant Nutrition*, Julho 2001);
  - ? Santos, C., Falcão, I., Pinto, G.,– Response of adapted and non-adapted sunflower cells to Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: II. Changes on proline accumulation and metabolism (submetido a *J. Plant Nutrition*, Julho 2001);
  - ? Saviouré, A. Jaoua, S., Hua, X., Ardiles, W., Montagu, M., Verbruggen, N., (1995) – Isolation, characterization and chromosomal location of a gene



- encoding  $\gamma^1$  – pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters 372: 13-19;
- ? Saxena, P. K., Krishnaraj, S., Dan, T., Perras, M.R., Vettakkorumakankav, N.N., (1999)- Phytoremediation of heavy metal contaminated and polluted soils - Heavy Metal Stress in Plants, From Molecules to Ecosystems, Prasad & Hagemeyer Eds;
  - ? Schat, H., Sharma, Vooijs, R., (1997) – heavy metal induced accumulation of free proline in a metal tolerant and a non-tolerant ecotype of *Silene vulgaris*. Physiol. Plant. 101: 477-482;
  - ? Sela, M., Tel-Or, E., Fritz, E., Huttermann, A., (1988), Localization and toxic effects of cadmium, copper, and uranium in *Azolla* – Plant Physiology, Vol. 88: 30-36;
  - ? Sohan, D., Janosi, R., Zajicek, J., (1999), Plant-water relations of NaCl and calcium treated sunflower plants – Environmental and experimental Botany, Vol. 42: 105-111;
  - ? Stobart, A., Griffiths, W., Bukhari, II., Sherwood, P., (1985), The effect of  $\text{Cd}^{2+}$  on biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley – Physiol. Plant., Vol. 63: 293-298;
  - ? Sudhakar, C., Reddy, P., Veeranjanyulu, K., (1993), Effect of salt stress on the enzymes of proline Synthesis and oxidation in *greengram* (*Phaseolus aureus* Roxb.) seedlings- J. Plant Physiology, Vol. 141: 621-623;
  - ? Toppi, L., Gabbrielli, R., (1999), Response to cadmium in higher plants- Environmental and Experimental Botany, Vol. 41 (2): 105-130;
  - ? Trivedi, S., Erdei, S., (1992), Effects of cadmium and lead on the accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  and on the influx and translocation of  $\text{K}^{+}$  in wheat of low and high  $\text{K}^{+}$  status – Physiologia Plantarum 84: 94-100;
  - ? Ranieri, A., Petacco, F., Castagna, A., Soldatini, G., (2000), Redox state and peroxidase system in sunflower plants exposed to ozone – Plant Science, Vol. 159: 159-167;
  - ? Wagner, G., e Yergan R., (1986), Variation in cadmium accumulation potencial and tissue distribution of cadmium in Tobacco – Plant Physiol. Vol. 82: 274-279;
  - ? Wignarajah, K., (1990), Growth response on *Phaseolus vulgaris* to varying salinity regimes – Environmental and Experimental Botany, Vol. 30, n° 2: 141-147;
  - ? Williamson, C. Slocum, R., (1992), Molecular cloning and evidence for osmoregulation of the  $\gamma$ -pyrroline-5-carboxylate reductase (proC) gene in Pea (*Pisum sativum* L. ) – Plant Physiology, Vol. 100: 1464-1470;
  - ? Zhu, B., Su, J., Chang, M., Fan, Y, Wu, R., (1998) Overexpression of a  $\gamma$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice – Plant Science, Vol. 139 (1): 41-48;